

Carine Dal Pizzol

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULA LIPÍDICA  
SÓLIDA CONTENDO UM ANÁLOGO DE PIRIMIDINA E  
AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTITUMORAL**

Tese submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Farmácia da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina como requisito parcial  
para a obtenção do Grau de  
Doutora em Farmácia na área de  
concentração de Fármaco-  
medicamentos

Orientadora: Prof. Dra. Tânia  
Beatriz Creczynski-Pasa

Coorientadora: Prof. Dra. Angela  
Machado de Campos

Florianópolis  
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Dal Pizzol, Carine Dal Pizzol

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULA LIPÍDICA SÓLIDA  
CONTENDO UM ANÁLOGO DE PIRIMIDINA E AVALIAÇÃO IN VITRO DA  
ATIVIDADE ANTITUMORAL / Carine Dal Pizzol Dal Pizzol ;  
orientadora, Tânia Beatriz Creczynski-Pasa Creczynski-Pasa  
; coorientadora, Angela Machado de Campos de Campos. -  
Florianópolis, SC, 2014.  
172 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-  
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Nanopartícula lipídica sólida. 3.  
Biocompatibilidade. 4. Leucemia. 5. Análogos de  
pirimidina. I. Creczynski-Pasa, Tânia Beatriz Creczynski-  
Pasa. II. de Campos, Angela Machado de Campos. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Farmácia. IV. Título.

**“DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULA  
LIPÍDICA SÓLIDA CONTENDO UM ANÁLOGO  
DE PIRIMIDINA E AVALIAÇÃO IN VITRO DA  
ATIVIDADE ANTITUMORAL”**

**POR**

**Carine Dal Pizzol**


Tese julgada e aprovada em sua  
forma final pelo(a) Orientador(a) e  
membros da Banca Examinadora,  
composta pelos Professores  
Doutores:

**Banca Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Helder Teixeira (UFRGS – Membro Titular)

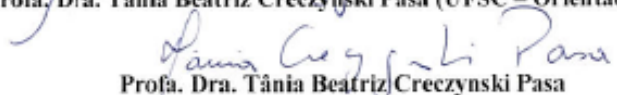
  
\_\_\_\_\_  
Dra. Betina Giehl Zanetti Ramos (Nanovetores – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Simone Gonçalves Cardoso (UFSC – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Lilian Sibelle Campos Bernades (UFSC – Membro  
Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Iara Fabricia Kretzer (UFSC – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa (UFSC – Orientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da  
UFSC

Florianópolis, 22 de agosto de 2014.





Este trabalho é dedicado aos meus pais, Lenito e Célia, meus tesouros.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pela vida e saúde. Por colocar em meu caminho mestres, amigos e seres humanos especiais e me ensinar a aprender com eles.

À minha orientadora, Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski-Pasa, pela amizade, imenso apoio, dedicação, carinho, confiança, ensinamentos e compreensão.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Angela Machado de Campos, por sempre confiar em meu trabalho, estímulo, imenso apoio, ensinamentos e amizade.

Aos membros da banca examinadora, pela contribuição neste trabalho.

Aos meus pais, irmão e namorado, por acreditarem nos meus sonhos, pelo amor, apoio nos momentos difíceis.

À professora Diva Sonaglio e ao André, pelas valiosas contribuições na etapa de interpretação dos resultados do delineamento experimental.

Ao grupo NUQUIMHE, especialmente ao professor Nilo Zanatta, pela disponibilização das moléculas, objeto deste trabalho.

Aos colegas e amigos do laboratório, pela amizade, carinho, ajuda durante a realização do trabalho e bons momentos de convivência. A vocês: Jelver, Evelyn, Laura, Adny, Fabíola, Paula, Fred, Daiane, Júlia, Clarissa, Vania, Ariana e Ivonete. Vocês foram essenciais!

À minha querida colega e amiga do coração, Evelyn, pelo companheirismo nestes anos e apoio incondicional em todas as etapas deste trabalho, estando sempre disponível em ajudar e ensinar.

Aos colegas e amigos do Programa de Pós Graduação em Farmácia, pela amizade, colaboração e momentos de convivência.

Ao Grupo Boticário, pelo incentivo e disponibilização de equipamentos. Aos colegas pela torcida e amizade.

Às minhas queridas amigas que me acompanharam nessa caminhada e me compreenderam nos momentos de desabafo, Fran, Deise, Clau, Be, Ju, Vá, Si, Di e May.

Ao CNPQ, CAPES e FAPESC e REUNI pelo suporte financeiro.

A todos que mesmo não citados, colaboraram para a realização deste trabalho.

*“Sobe mais alto aquele que ajuda o outro a subir”*  
(George Adams)



*“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.*

(Isaac Newton)



## RESUMO

Esta tese está sendo apresentada em quatro etapas. A primeira foi avaliar doze moléculas de análogos de pirimidina, quanto ao aspecto de citotoxicidade e tipo de morte celular em três linhagens celulares tumorais (L1210, B16F10 e CEM). Quatro moléculas apresentaram efeito citotóxico relevante. Assim, prosseguiu-se a avaliação da molécula C<sub>3</sub>, escolhida entre as quatro pela facilidade de obtenção. Testes preliminares apresentaram baixa solubilidade em água, o que dificultaria a administração parenteral. Desta maneira, a segunda etapa foi desenvolver uma formulação para facilitar a administração desta molécula *in vivo*. Neste sentido, foi realizada a avaliação da influência do emulsificante e do tipo de lipídeo nas características físico-químicas e na biocompatibilidade de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS). Formulações foram preparadas com diferentes lipídeos (tripalmitina (TRP), monoestearato de glicerila (MEG) e ácido esteárico (AE)) e emulsificantes (polissorbato 80 e lecitina S75) em diferentes concentrações. Os estudos de biocompatibilidade celular realizados foram: viabilidade celular por MTT, análise da morfologia celular por laranja de acridina, ciclo celular por citometria de fluxo e hemólise de eritrócitos. As formulações demonstraram boa estabilidade físico-química e apresentaram um tamanho de partícula entre 116 a 306 nm, com índice de polidispersão (PI) entre 0,25 a 0,30 com valores negativos para o potencial zeta (PZ). As NLS produzidas com AE mostraram maior citotoxicidade *in vitro* quando comparadas com as NLS produzidas com TRP e MEG e apresentaram atividade hemolítica. A terceira etapa foi otimizar uma formulação de NLS aplicando um delineamento experimental. A partir desta otimização, NLS foram preparadas pelo método de ultrassom e o C<sub>3</sub> foi incorporado em diferentes concentrações (250, 500 e 1000 µg.mL<sup>-1</sup>). Um método por cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvido e validado para o doseamento do C<sub>3</sub> incorporado nas NLS. A adição de diferentes quantidades de C<sub>3</sub> nas formulações não afetou o diâmetro médio das nanopartículas. O PI foi menor que 0,22 para todas as formulações. O PZ das NLS apresentaram valor negativo e houve variações entre as formulações preparadas indicando a adsorção do C<sub>3</sub> na superfície das nanopartículas. A eficiência de encapsulação foi maior que 97% para as formulações desenvolvidas. O estudo de estabilidade revelou expulsão do C<sub>3</sub> da NLS ao longo do tempo, assim um estudo de liofilização foi realizado. Boas características de ressuspensão foram atingidas e o teor de C<sub>3</sub> foi mantido ao longo do tempo. O ensaio de liberação indicou uma

eficiência na retenção do C<sub>3</sub> pelas NLS. No estudo de citotoxicidade com linhagem celular tumoral L1210, as NLS contendo a molécula encapsulada apresentou um perfil de toxicidade semelhante à molécula livre. Por fim, como quarta etapa deste trabalho, visando facilitar uma possível passagem de escala, foi realizada uma comparação das características das NLS produzidas pela técnica de ultrassonicação e de homogeneização por alta pressão. Como conclusão, os resultados obtidos revelaram a capacidade de incorporação de uma molécula pouco solúvel em NLS, o que viabiliza a administração parenteral e torna este sistema adequado para testes *in vivo*.

**Palavras-chave:** Nanopartículas lipídicas sólidas, biocompatibilidade, Leucemia, análogos de pirimidina.



## ABSTRACT

This thesis is presented in four steps. The first step in this work was the evaluation of the cytotoxicity of twelve pyrimidine analogs in three cell lines (L1210, B16F10 and CEM) and to assess the type of cell death induced by these molecules. Four molecules showed significant cytotoxic effect. Thus, C<sub>3</sub> molecule was chosen to continue the study because it is easy to obtain it. Preliminary tests showed low solubility of the molecule in water, making it difficult to parenteral administration. Therefore, the second step was to develop a formulation to facilitate the administration of this molecule *in vivo*. In this regard, a review of the preliminary influence of the emulsifier and the lipid type on the physicochemical characteristics and biocompatibility of solid lipid nanoparticles (SLN) were performed. Formulations were prepared with lipids commonly used for production of SLN (tripalmitin (TRP), glyceryl monostearate (MEG) and stearic acid (SA) and emulsifiers (polysorbate 80 and lecithin S75) at different concentrations. Cell biocompatibility studies were performed: cell viability by MTT analysis of cell morphology with acridine orange stain, cell cycle by flow cytometry and hemolysis of erythrocytes. The formulations studied showed good physical-chemical stability and they showed the particle size between 116 and 306 nm, polydispersity index (PI) 0.25 and 0.30 with negative zeta potencial (PZ) values. The SLN manufactured using SA showed greater cytotoxicity *in vitro* when compared to SLN produced with MEG and TRP, and SNL-SA showed hemolytic activity. The third step was to optimize a formulation of NLS applying an experimental design. The optimized formulation was prepared by the ultrasound method and C<sub>3</sub> was incorporated at different concentrations in SLN (250, 500 and 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A high performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed and validated for the quantitative determination of C<sub>3</sub> in SLN. The addition of different amounts of C<sub>3</sub> in the formulation did not affect the mean diameter of the nanoparticles. The PI was less than 0.22 for all formulations. PZ of the SLN showed a negative value and there were variations among the formulations prepared indicating adsorption of the C<sub>3</sub> on the surface of nanoparticles. The encapsulation efficiency was higher than 97% for all the formulations developed. The stability study revealed expulsion of the C<sub>3</sub> in SLN over time, and for this a lyophilisation study was conducted. Good proprieties of resuspension were established and the formulations stability were maintained over time. The release assay indicated a retention of the C3 in NLS. The cytotoxicity study with

L1210 cell lines the SLN containing C<sub>3</sub> encapsulated showed a similar profile to the free-molecule cytotoxicity. Finally, as a fourth step of this work, to facilitate a possibility to scale up, a comparison of the SLN physicochemical proprieties produced by the ultrasound method and high pressure homogenization was performed. The results showed that both techniques are suitable for the production of SLN. In conclusion, these findings suggest that a pyrimidine analogue loaded solid lipid nanoparticle is a promising formulation for parenteral administrations and that it suitable for *in vivo* testing.

**Keywords:** Solid lipid nanoparticles, biocompatibility, Leukemia, pyrimidine analogs

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estruturas químicas de fármacos pirimidínicos. .... 43
- Figura 2.** Desenho experimental..... 60
- Figura 3.** Citotoxicidade dos análogos de pirimidina em células L1210. As células ( $1 \times 10^5$ ) foram incubadas por 24 h de 50  $\mu\text{M}$  e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. .... 80
- Figura 4.** Citotoxicidade dos análogos de pirimidina em células B16F10. As células ( $1 \times 10^5$ ) foram incubadas por 24 h de 50  $\mu\text{M}$  e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. .... 80
- Figura 5.** Citotoxicidade dos análogos de pirimidina em células CEM. As células ( $1 \times 10^5$ ) foram incubadas por 24 h com 50  $\mu\text{M}$  de cada composto, separadamente, e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT..... 81
- Figura 6.** Atividade das pirimidinas dependente da concentração em células L1210.  $1 \times 10^5$  células foram incubadas com as pirimidinas (0-50  $\mu\text{M}$ ) por 24 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT e a densidade ótica do grupo controle sem tratamento foi considerada 100% de viabilidade. Cada ponto representa Média  $\pm$  EPM ( $n=3$ ). ..... 82
- Figura 7.** Atividade das pirimidinas dependente da concentração em células B16F10.  $1 \times 10^5$  células foram incubadas com as pirimidinas (0-50  $\mu\text{M}$ ) por 24 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT e a densidade ótica do grupo controle sem tratamento foi considerada 100% de viabilidade. Cada ponto representa Média  $\pm$  EPM ( $n=3$ ). ..... 82
- Figura 8.** Atividade das pirimidinas dependente da concentração em células CEM.  $1 \times 10^5$  células foram incubadas com as pirimidinas (0-50  $\mu\text{M}$ ) por 24h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT e a densidade ótica do grupo controle sem tratamento foi considerada 100% de viabilidade. Cada ponto representa Média  $\pm$  EPM ( $n=3$ ). ..... 83
- Figura 9.** Análise do DNA de células L1210. As células ( $3 \times 10^6$ ) foram incubadas com as pirimidinas A<sub>5</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, B<sub>2</sub> por 24 h, nas respectivas concentrações das IC<sub>50</sub>, sendo representadas na figura pelos respectivos

códigos. C representa o controle de células sem tratamento e P o padrão de peso molecular de DNA. .... 84

**Figura 10.** Característica macroscópica das formulações preparadas...88

Figura 11. Imagens por microscopia electrónica de transmissão (MET) das formulações.....89

**Figura 12.** Estabilidade das NLS em função do tempo. (A) Tamanho das NLS F1-F6 até 60 dias a 25 °C. (B) Tamanho das NLS F1-F6 até 60 dias a 4 °C. (C) Potencial Zeta das NLS F1-F6 até 60 dias a 25 °C. (D) Potencial Zeta das NLS F1-F6 até 60 dias a 4 °C. (E) Índice de polidispersão das NLS F1-F6 até 60 dias a 25 °C. (F) Índice de polidispersão das NLS F1-F6 até 60 dias a 4 °C.....90

**Figura 13.** Análise do ciclo celular de fibroblastos após 24 h de exposição com as NLS analisadas por citometria de fluxo. Formulações (A) contendo tripalmitina como matriz lipídica; (B) as formulações contendo monoestearato de glicerila como matriz lipídica; e (C) as formulações contendo o ácido esteárico como matriz lipídica. Os dados são expressos como a média ± EP de triplicata independentes.....93

**Figura 14.** Microscopia de células coradas com laranja de acridina ( $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e brometo de etídio ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) após 24 horas de exposição com as NLS F1-F9. Imagens dos campos foram adquiridas com uma ampliação de 200 X.....95

**Figura 15.** Quantificação de células viáveis e mortas de acordo com a identificação morfológica obtido por coloração dupla com laranja de acridina ( $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e brometo de etídio ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) depois de 24 horas de exposição com as NLS F1-F9. (V) Células viáveis; (A) Células em apoptose; (N) Células necróticas. Os dados são apresentados como média ± EP de seis campos. ....96

**Figura 16.** Atividade hemolítica das NLS (F1 a F9) em eritrócitos humanos. As células sanguíneas foram expostas com as NLS por uma hora Os dados são apresentados como média ± EP,  $n=3$ . ....97

**Figura 17.** Gráficos de contorno avaliando o efeito da (A) concentração do emulsionante *versus* a quantidade de solvente (MEG; 250 mg de lipídeo) e (B) quantidade de solvente *versus* quantidade de lipídeo

(MEG; 1,25 % de emulsionante) sobre o tamanho de partícula das NLS (nm). ..... 103

**Figura 18.** Gráficos de contorno avaliando o efeito da (A) concentração do emulsionante *versus* a quantidade de lipídeo (TRP; 0,3 mL de solvente) e (B) quantidade de emulsionante *versus* quantidade de solvente (TRP; 250 mg de lipídeo) sobre o índice de polidispersão (PI) das NLS (adimensional). ..... 105

**Figura 19.** (A) Gráfico de contorno avaliando o efeito da concentração do emulsionante *versus* a quantidade de lipídeo (TRP; 0,4 mL de solvente) e (B) Gráfico de interação entre quantidade de solvente *versus* tipo de lipídeo (1,25 % de emulsionante; 250 mg de lipídeo), ambos sobre o potencial zeta ( $\zeta$ ) das NLS (mV). ..... 107

**Figura 20.** Fotomicrografias obtidas por MET da formulação otimizada de nanopartículas lipídicas sólidas ..... 110

**Figura 21.** Efeito do tempo de armazenamento à temperatura 4 °C sobre o tamanho de partícula e PI da formulação otimizada de NLS (média  $\pm$  DP, n = 3) ..... 110

**Figura 22.** Perfil de citotoxicidade da NLS em linhagem celular NIH/3T3 após 24 h de incubação. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT e a densidade ótica do grupo controle sem tratamento foi considerada 100% de viabilidade. Cada barra representa Média  $\pm$  EPM (n=3). ..... 111

**Figura 23.** Espectro de absorção do C<sub>3</sub> na região do ultra-violeta (UV) ..... 113

**Figura 24.** Curva de calibração média do C<sub>3</sub> obtida por CLAE e respectiva equação da reta. .... 114

**Figura 25.** (A) Cromatograma da formulação de NLS branca contaminada com C<sub>3</sub> (B) Cromatograma da formulação de NLS branca. .... 115

**Figura 26.** Caracterização macroscópica das formulações (A) NLS branca (B) NLS 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (C) NLS 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (D) NLS 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ..... 117

**Figura 27.** Distribuição de tamanho das NLS na presença de diferentes quantidades de C<sub>3</sub> encapsuladas (vermelho 250 µg.mL<sup>-1</sup>; verde 500 µg.mL<sup>-1</sup>; azul 1000 µg.mL<sup>-1</sup>)..... 119

**Figura 28.** Termogramas por calorimetria exploratória diferencial. (A) NLS-1000; (B) NLS-500; (C) NLS-250; (D) Tripalmitina; (E) NLS branca; (F) molécula C<sub>3</sub> ..... 121

**Figura 29.** Curva de calibração média da molécula C<sub>3</sub> obtida por CLAE e sua respectiva equação da reta..... 123

**Figura 30.** Cromatograma típico obtido por CLAE do meio de dissolução (Solução de 5 % de polissorbato 80 : Propilenoglicol (50:50) (v/v))..... 124

**Figura 31.** Perfil de liberação *in vitro*. (●) C<sub>3</sub> livre; (■) NLS-250; (▲) NLS-500; (▼) NLS-1000. (média ± DP, n = 3) ..... 125

**Figura 32.** Perfil de degradação do C<sub>3</sub> em função do tempo. (●) NLS-250; (■) NLS-500; (▲) NLS-1000. (média ± DP, n = 3) ..... 126

**Figura 33.** Tamanho da partícula (nm) *versus* quantidade de trealose (%) após estudo de liofilização. (A) Ressuspensão com agitação manual; (B) Ressuspensão com banho de ultrassom por 5 min. (média ± DP, n = 3) ..... 127

**Figura 34.** Viabilidade celular em células L1210. (●) NLS branca; (▲) C<sub>3</sub> livre; (▼) C<sub>3</sub>-NLS. As células (1x10<sup>5</sup>) foram incubadas por 24 h e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Cada ponto representa Média ± EP (n=3). ..... 129

**Figura 35.** Ensaio de viabilidade celular após incubação com NLS produzidas pela técnica de homogeneização de alta pressão e pela técnica de ultrassonificação em células de fibroblasto. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT (24 h) e a densidade ótica do grupo controle sem tratamento foi considerada 100% de viabilidade. Cada barra representa Média ± EPM (n=3). ..... 134

## LISTA DE TABELAS

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabela 1.</b> Características dos compostos sintetizados .....   | 60  |
| <b>Tabela 2.</b> Variáveis independentes numéricas e categóricas e seus respectivos níveis .....  | 68  |
| <b>Tabela 3.</b> Composição (% m/v) das NLS .....   | 72  |
| <b>Tabela 4.</b> Valores de $CC_{50}$ das pirimidinas A <sub>5</sub> , C <sub>2</sub> e C <sub>3</sub> , após 24 h de incubação, em células L1210, CEM e B16F10. .... | 83  |
| <b>Tabela 5.</b> Composição das formulações de NLS .....  | 87  |
| <b>Tabela 6.</b> Características das NLS: tamanho, IP e PZ .....  | 88  |
| <b>Tabela 7.</b> $CC_{50}$ das NLS em linhagem celular de fibroblastos de origem murina NIH/3T3 .....   | 92  |
| <b>Tabela 8.</b> Composição das NLS e resultados obtidos dos parâmetros analisados. ....  | 100 |
| <b>Tabela 9.</b> Resultado da análise de variância para as respostas obtidas. ....  | 101 |
| <b>Tabela 10.</b> Dados para otimização da formulação.....  | 108 |
| <b>Tabela 11.</b> Resultado da formulação otimizada .....   | 109 |
| <b>Tabela 12.</b> Comparação das respostas das formulações teórica e experimental otimizadas.....   | 109 |
| <b>Tabela 13.</b> Áreas dos picos médios obtidas após análise das soluções de pirimidina por CLAE (n=3).....  | 113 |
| <b>Tabela 14.</b> Valores experimentais médios obtidos durante o estudo da precisão do método (n=6).....  | 116 |
| <b>Tabela 15.</b> Valores de recuperação (%) obtidos após adicionar diferentes concentrações de C <sub>3</sub> (µg/mL) em uma NLS branca (n=3) .                      | 116 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabela 16.</b> Caracterização físico-química das NLS (n = 3) .....  | 118 |
| <b>Tabela 17.</b> Solubilidade do C <sub>3</sub> nos meios avaliados, expressa como concentração de saturação.....   | 122 |
| <b>Tabela 18.</b> Áreas dos picos médios obtidas após análise das soluções de C <sub>3</sub> por CLAE (n=3) .....  | 123 |
| <b>Tabela 19.</b> Comparação do estudo de estabilidade em função do tempo (média ± DP, n = 3).....   | 128 |
| <b>Tabela 20.</b> Caracterização físico-química dos sistemas nanoestruturados lipídicos (n = 3) produzidos pela técnica de homogeneização à alta pressão.....                  | 132 |
| <b>Tabela 21.</b> Caracterização físico-química dos sistemas nanoestruturados lipídicos produzidos pela técnica de ultrassom (n=3). Valores apresentados como média ± DP ..... | 132 |



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                  |   |
|------------------|---|
| AE               | Ácido Esteárico                                   |
| ANOVA            | Análise de variância                              |
| ANVISA           | Agência Nacional de Vigilância Sanitária          |
| B16F10           | Linhagem celular de melanoma de origem murina     |
| C <sub>3</sub>   | Análogo de pirimidina                             |
| CC <sub>50</sub> | Concentração que inibe 50% do crescimento celular |
| CEM              | Linhagem de leucemia linfoblástica humana         |
| CLAE             | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência          |
| DLS              | Dispersão por luz dinâmica                        |
| DMEM             | Meio de Cultura Eagle's Modificado                |
| DMSO             | Dimetilsulfóxido                                  |
| DP               | Desvio Padrão                                     |
| DPR              | Desvio Padrão Relativo                            |
| DSC              | Calorimetria Exploratória Diferencial             |
| EE               | Eficiência de Encapsulação                        |
| EGIL             | Classificação Imunológica das Leucemias           |
| EP               | Erro padrão                                       |
| GSH              | Glutathione                                       |
| ICH              | <i>International Conference on Harmonisation</i>  |
| L1210            | Linhagem de leucemia linfóide aguda murina        |
| LD               | Limite de detecção                                |
| LLA              | Leucemia linfóide aguda                           |
| LMA              | Leucemia mielóide aguda                           |
| LQ               | Limite de quantificação                           |
| MEG              | Monoestearato de Glicerila                        |
| MET              | Microscopia eletrônica de transmissão             |
| MSR              | Metodologia de resposta                           |
| MTT              | Brometo de dimetiazol difeniltetrazólio           |
| NIH-3T3          | Linhagem celular de fibroblasto de origem murina  |
| NLS              | Nanopartícula lipídica sólida                     |
| O/A              | Óleo em água                                      |
| OMS              | Organização Mundial da Saúde                      |
| PBS              | Tampão Fosfato Salino                             |
| PI               | Índice de Polidispersão                           |
| PZ               | Potencial Zeta                                    |
| R <sup>2</sup>   | Coefficiente de correlação                        |
| RPM              | Rotações por minuto                               |
| SNC              | Sistema Nervoso Central                           |
| TRP              | Tripalmitina                                      |



## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>27</b> |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>   | <b>31</b> |
| 2.1 Objetivo Geral .....  | 33        |
| 2.2 Objetivos Específicos .....                                     | 33        |
| <b>3. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>                               | <b>35</b> |
| 3.1. Aspectos gerais do câncer .....                                | 37        |
| 3.2. Leucemias .....  | 38        |
| 3.2.1. Leucemia Linfóide Aguda .....                                | 39        |
| 3.3. Análogos de pirimidinas .....                                  | 42        |
| 3.4. Via de administração parenteral .....                          | 44        |
| 3.5. Nanotecnologia e o câncer .....                                | 45        |
| 3.4.1. Nanopartículas Lipídicas Sólidas .....                       | 48        |
| 3.4.1.1. Técnicas De Preparo De Nls .....                           | 49        |
| 3.4.1.1.1. Técnica de homogeneização em alta pressão .....          | 49        |
| 3.4.1.1.2. Técnica de homogeneização por sonda de ultrassom .....   | 50        |
| 3.4.1.1.3. Técnica a partir de microemulsões .....                  | 51        |
| 3.4.1.1.4. Técnica de evaporação do solvente .....                  | 51        |
| 3.5. Métodos para caracterização de NLS .....                       | 51        |
| 3.5.1. Determinação de Tamanho de Partícula .....                   | 52        |
| 3.5.2. Potencial Zeta (Z) .....                                     | 52        |
| 3.5.3. Avaliação Morfológica .....                                  | 53        |
| 3.5.4. Eficiência De Encapsulação .....                             | 54        |
| 3.5.5. Estabilidade Química, Físico-Química, Biológica .....        | 54        |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>                                 | <b>57</b> |
| 4.1. Materiais .....  | 59        |
| 4.2. Métodos .....  | 59        |
| 4.2.1. Avaliação da morte celular dos análogos de pirimidinas ..... | 59        |
| 4.2.1.1. Síntese das Pirimidinas .....                              | 60        |
| 4.2.1.2. Cultura Celular .....                                      | 62        |
| 4.2.1.3. Tratamento Celular .....                                   | 63        |
| 4.2.1.4. Ensaio de Viabilidade Celular .....                        | 63        |

|          |   |    |
|----------|---|----|
| 4.2.1.5. | Determinação da Curva de Concentração <i>versus</i> Resposta  | 63 |
| 4.2.1.6. | Análise da Apoptose pelo Método de Fragmentação do DNA  | 64 |
| 4.2.2.   | Avaliação da influência dos componentes de formulação sobre as propriedades e biocompatibilidade de NLS | 64 |
| 4.2.2.1. | Preparação das nanopartículas lipídicas sólidas   | 64 |
| 4.2.2.2. | Caracterização do tamanho, polidispersão e potencial zeta   | 65 |
| 4.2.2.3. | Morfologia – Microscopia eletrônica de transmissão (MET)  | 65 |
| 4.2.2.4. | Estudo de Estabilidade  | 65 |
| 4.2.2.5. | Estudo de Biocompatibilidade Celular  | 65 |
| 4.2.2.6. | Análise do ciclo celular  | 66 |
| 4.2.2.7. | Identificação do tipo de morte celular  | 66 |
| 4.2.2.8. | Determinação da Hemólise  | 67 |
| 4.2.3.   | Aplicação de delineamento experimental para otimizar uma formulação                                     | 67 |
| 4.2.3.1. | Condições do delineamento experimental  | 67 |
| 4.2.3.3. | Caracterização das NLS  | 68 |
| 4.2.3.4. | Estudo de Estabilidade  | 68 |
| 4.2.3.5. | Estudo de Biocompatibilidade: Ensaio de MTT   | 69 |
| 4.2.3.6. | Determinação da Hemólise  | 69 |
| 4.2.4.   | Desenvolvimento e validação do método de doseamento da molécula C <sub>3</sub> nas NLS                  | 69 |
| 4.2.4.1. | Determinação do comprimento de onda de absorção máxima do C <sub>3</sub>                                | 69 |
| 4.2.4.2. | Condições cromatográficas   | 69 |
| 4.2.4.3. | Linearidade   | 70 |
| 4.2.4.4. | Especificidade  | 70 |
| 4.2.4.5. | Exatidão  | 70 |
| 4.2.4.6. | Precisão  | 70 |
| 4.2.4.7. | Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD)  | 71 |
| 4.2.5.   | Incorporação da molécula C <sub>3</sub> em NLS  | 71 |
| 4.2.5.1. | Preparação da NLS   | 71 |
| 4.2.5.2. | Caracterização do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta                                     | 72 |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 4.2.5.3.   | Eficiência de encapsulação.....   | 72        |
| 4.2.5.4.   | Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....   | 73        |
| 4.2.5.5.   | Validação do método de liberação <i>in vitro</i> .....  | 73        |
| 4.2.5.5.1. | Condições cromatográficas.....  | 73        |
| 4.2.5.5.2. | Determinação da solubilidade do C <sub>3</sub> em diferentes meios de dissolução73  |           |
| 4.2.5.5.3. | Linearidade .....   | 73        |
| 4.2.5.5.4. | Especificidade frente à composição do meio de liberação<br>74   |           |
| 4.2.5.5.5. | Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)<br>74  |           |
| 4.2.5.6.   | Estudo de Liberação .....   | 74        |
| 4.2.5.7.   | Estudo de Estabilidade .....  | 74        |
| 4.2.5.8.   | Estudo de Liofilização das formulações.....   | 75        |
| 4.2.5.9.   | Ressuspensão das NLS após liofilização .....  | 75        |
| 4.2.5.10.  | Estudo de Citotoxicidade .....  | 75        |
| 4.2.6.     | Comparação do método de produção de NLS .....   | 75        |
| 4.2.6.1.   | Preparação das NLS .....  | 75        |
| 4.2.6.1.1. | Método de Ultrassom.....  | 75        |
| 4.2.6.1.2. | Método de Homogeneização por alta pressão .....   | 76        |
| 4.2.6.2.   | Caracterização do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta .....   | 76        |
| 4.2.6.3.   | Estudo de biocompatibilidade: Ensaio de MTT .....   | 76        |
| 4.2.7.     | Análise Estatística .....   | 76        |
| <b>5.</b>  | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>   | <b>77</b> |
| 5.1.       | Avaliação da citotoxicidade de análogos de Pirimidina .....   | 79        |
| 5.2.       | Determinação da Curva de Concentração <i>versus</i> Resposta.....   | 81        |
| 5.3.       | Análise do tipo de morte celular.....   | 84        |
| 5.4.       | Estudo de Formulação 1: Influência do emulsionante e do tipo de lipídeo nas características físico-químicas e na biocompatibilidade de nanopartículas lipídicas sólidas ..... | 86        |
| 5.4.1.     | Caracterização das NLS .....  | 86        |
| 5.4.2.     | Estudo de Estabilidade.....   | 89        |
| 5.4.3.     | Estudo de Biocompatibilidade celular .....  | 91        |

|           |  |            |
|-----------|--|------------|
| 5.4.4.    | Análise do Ciclo celular.....  | 92         |
| 5.4.5.    | Identificação do tipo de morte celular .....   | 94         |
| 5.4.6.    | Determinação da Hemólise.....  | 96         |
| 5.5.      | Estudo de Formulação 2: Aplicação de delineamento experimental para otimizar uma formulação..... | 97         |
| 5.5.1.    | Morfologia – Microscopia eletrônica de transmissão.....  | 109        |
| 5.5.2.    | Estudo de estabilidade da formulação de NLS otimizada .....                                      | 110        |
| 5.5.3.    | Estudo de Biocompatibilidade da formulação otimizada .....                                       | 111        |
| 5.6.      | Desenvolvimento e validação do método de doseamento da molécula C <sub>3</sub> nas NLS .....     | 112        |
| 5.7.      | Incorporação do Composto C <sub>3</sub> na formulação otimizada de NLS<br>116                    |            |
| 5.7.1.    | Caracterização físico-química das formulações .....  | 117        |
| 5.7.2.    | Análise das NLS por Calorimetria Exploratória Diferencial.....                                   | 120        |
| 5.7.3.    | Desenvolvimento do método de Liberação do C <sub>3</sub> a partir das NLS <i>in vitro</i> .....  | 121        |
| 5.7.3.1.  | Determinação da solubilidade de C <sub>3</sub> em diferentes meios de dissolução                 | 121        |
| 5.7.3.2.  | Validação do método de liberação do C <sub>3</sub> incorporado em NLS                            | 122        |
| 5.7.3.3.  | Linearidade.....   | 122        |
| 5.7.3.4.  | Especificidade frente à composição do meio de dissolução   | 123        |
| 5.7.3.5.  | Limite de quantificação e Limite de Detecção.....  | 124        |
| 5.7.4.    | Estudo de Liberação do C <sub>3</sub> <i>in vitro</i> .....                                      | 124        |
| 5.7.5.    | Estudo de Estabilidade.....  | 125        |
| 5.7.6.    | Estudo de Liofilização das NLS .....   | 126        |
| 5.7.7.    | Estudo de Citotoxicidade (L1210).....  | 128        |
| 5.8.      | Comparação do método de produção de NLS.....   | 130        |
| 5.8.1.    | Estudo de Biocompatibilidade .....   | 133        |
| <b>6.</b> | <b>CONCLUSÕES .....</b>  | <b>137</b> |
| <b>7.</b> | <b>REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>143</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

---





O câncer e outras doenças crônicas não transmissíveis vêm tornando-se cada vez mais comuns no mundo, ficando evidente um problema de saúde pública mundial. No Brasil, o câncer ganha relevância pelo perfil epidemiológico que esta doença vem apresentando. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a cada ano ocorrem cerca de 10 milhões de novos casos de câncer, sendo a metade destes em países em desenvolvimento.

As opções terapêuticas atuais incluem cirurgia, quimioterapia e radioterapia, sendo a cirurgia e radioterapia consideradas como tratamentos locais e a quimioterapia como tratamento sistêmico, ambos podem ser usados isolados ou associados. A imunoterapia e a terapia fotodinâmica também representam uma alternativa de tratamento (OLIVO et al., 2010; CEYHAN et al., 2011). Além disso, novas estratégias terapêuticas baseadas no âmbito molecular estão sendo desenvolvidas, utilizando fármacos antiangiogênicos e imunomoduladores, terapia antisenso Bcl-2, moduladores de proteínas de choque térmico, inibição citotóxica do linfócito T associado à proteína 4 (CTLA- 4), anticorpos monoclonais (MABs), inibição da poli(ADP-ribose) polimerase (PARP) e inibidores de proteossoma (JANSEN, ZANGEMEISTER-WITTKE, 2002; RIVOLTINI et al., 2003; SREEDHAR, CSERMELY, 2004; THOMPSON, ALLISON, KWON, 2006; PARK, CHEN, 2012).

Uma alternativa promissora no tratamento antitumoral pode ser o estabelecimento de novas terapias que promovam a manipulação da via apoptótica podendo atuar em vários mecanismos como no desequilíbrio do balanço antioxidante, principalmente através da depleção da GSH e/ou através da geração de espécies reativas, depleção do potencial energético, além da inibição das moléculas de adesão que impeçam o desenvolvimento de metástases. Desta forma, o entendimento da sinalização intracelular pela qual os fármacos ou novos fármacos conduzem à apoptose é de fundamental importância para o esclarecimento dos possíveis alvos para intervenção terapêutica e para elucidação dos mecanismos de resistência aos fármacos (LOCATELLI et al., 2012; SALUM et al., 2013; RANGEL et al., 2013).

A leucemia é uma doença que se origina a partir de células brancas do sangue. Clínica e patologicamente, subdivide-se em grandes grupos. A primeira divisão baseia-se nas formas agudas e crônicas da doença. A leucemia aguda caracteriza-se por um aumento rápido nos números de células imaturas do sangue, fazendo com que a medula óssea seja incapaz de reproduzir células sanguíneas saudáveis. Já a forma crônica de leucemia caracteriza-se pelo aumento excessivo do número de células maduras anormais da série branca do sangue, levando meses ou até anos para progredir. A segunda divisão diz respeito ao tipo de célula afetada pelas

desordens, sendo assim caracterizada como do tipo linfóide ou mielóide (BRASIL, 2013).

Nos últimos anos, a busca por alternativas mais eficientes e menos tóxicas para contornar os efeitos indesejáveis, limitações e inconveniências da quimioterapia para o tratamento do câncer, tem despertado o interesse de pesquisadores de várias áreas. Neste sentido, cabe destacar os resultados que vem sendo obtidos com a utilização de sistemas de liberação de fármacos, comumente descritos como “*drug delivery systems*”.

A utilização de sistemas de liberação de fármacos no tratamento do câncer vem ampliando as expectativas e esforços de pesquisadores em todo o mundo (BRANNON- PEPPAS et al, 2004; KIM, 2007; ELSAYED, et al, 2007; PARK, 2007; TORCHILIN, 2007; PRAKASH et al., 2011). Esta tecnologia atende a necessidade da administração de quimioterápicos com mais segurança e a diminuição da dose com otimização dos efeitos terapêuticos, permitindo, assim, o aumento da seletividade do agente antitumoral, a minimização da toxicidade e a elevação das taxas de cura em diferentes tipos de câncer. Como exemplo de sistema de liberação de fármacos, as nanopartículas têm demonstrado um grande potencial no tratamento de diversas doenças, com destaque para a terapia antineoplásica, já que possibilitam de maneira racional e efetiva, o aumento da eficiência terapêutica de diferentes substâncias, inclusive aquelas consideradas potencialmente tóxicas (ELSAYED, et al, 2007; PARK, 2007; TORCHILIN, 2007; BOLHASSANI, 2011; YANG et al., 2011, WOLINSKY, COLSON, GRINSTAFF, 2012).

Dado ao exposto, o objetivo deste trabalho é desenvolver um sistema nanocarreador lipídico sólido e avaliar o potencial antitumoral de uma nova molécula, um análogo de pirimidina, livre ou incorporada no carreador, em ensaios *in vitro*, em modelo celular.

## **2. OBJETIVOS**

---



## 2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um sistema nanocarreador lipídico sólido e avaliar o potencial antitumoral de uma nova molécula, um análogo de pirimidina, livre ou incorporada no carreador, em ensaios *in vitro*, em modelo celular de leucemia linfoblástica aguda murina (L1210).

## 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito citotóxico de análogos de pirimidinas sobre a linhagem celular L1210, CEM e B16F10 bem como verificar o tipo de morte;
- Avaliar a influência do emulsionante e do tipo de lipídeo nas características físico-químicas e na biocompatibilidade de nanopartículas lipídicas sólidas;
- Aplicar um delineamento experimental para otimizar a preparação de um sistema de nanopartículas lipídicas sólidas;
- Caracterizar as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) quanto as características físico-químicas e morfológicas;
- Desenvolver e validar uma metodologia analítica para o doseamento do análogo de pirimidina (C<sub>3</sub>) incorporado nos nanocarreadores;
- Caracterizar as NLS contendo o C<sub>3</sub> quanto ao tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta, morfologia, eficiência de encapsulação, cinética de liberação e citotoxicidade em linhagem celular L1210;
- Realizar um estudo de liofilização com as NLS contendo o C<sub>3</sub>;
- Comparar dois métodos de produção das NLS utilizando a ultrassonicação e o homogeneizador de alta pressão quanto às características físico-químicas das NLS produzidas por estas técnicas.



### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

---





### **3.1. ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER**

O Câncer consiste em um grupo de doenças que mais causam temor na sociedade, considerado um estigma de mortalidade e dor. É definido como enfermidade multicausal crônica, caracterizada pelo crescimento descontrolado de células podendo invadir órgãos ou partes do corpo adjacentes ao foco inicial (ALMEIDA et al., 2005, WHO, 2014).

Nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que no ano 2030 pode-se esperar 27 milhões de novos casos de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média rendas (WHO, 2014).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), as estimativas para o ano de 2014 serão válidas também para o ano de 2015 e aponta a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país (BRASIL, 2014).

Apesar de muitos tumores resultarem de alterações celulares hereditárias, a maioria dos casos (cerca de 80%) está relacionada ao meio ambiente, onde se encontra um grande número de fatores de risco (ALMEIDA et al., 2005). Os principais fatores externos envolvidos são: radiação ultravioleta e ionizante, produtos químicos como asbesto, aflatoxinas, arsênio, componentes do tabaco, alguns vírus, bactérias, parasitas entre outros (WHO, 2014).

As causas primárias do câncer são variadas e algumas delas ainda não estão esclarecidas. No entanto, sabe-se que as neoplasias originam-se a partir de mutações genéticas espontâneas ou induzidas por agentes patogênicos, as quais promovem alterações no ciclo celular e, como consequência, elevação na taxa de proliferação e desregulação no processo de morte celular programada. Em geral, a formação do câncer origina-se lentamente culminando em um ponto final de um processo que passa por várias etapas antes de formar a massa tumoral (ALMEIDA et al., 2005).

Os tumores apresentam basicamente dez alterações fisiológicas: autossuficiência para sinais de proliferação, insensibilidade a sinais inibitórios de proliferação, evasão da morte celular programada, potencial de replicação ilimitado, angiogênese sustentada, invasão de tecidos ou desenvolvimento de metástases, evasão da destruição pelo sistema imune, instabilidade genômica, desregulação do metabolismo energético celular e

ativação da inflamação pelo sistema imune inato (HANAHAAN; WEINBERG, 2011).

Apesar da prevalência de câncer de próstata e de pulmão no sexo masculino, e de mama e de colo de útero, no sexo feminino, outros tipos de câncer vêm adquirindo importância clínica, tais como as leucemias linfóides agudas. Este fato se deve ao aumento da incidência nas últimas décadas e principalmente pelo mau prognóstico (PEJOVIC, 2002; BRASIL, 2014).

### **3.2. LEUCEMIAS**

As leucemias são doenças proliferativas de curso progressivo e irreversível do tecido hematopoético. São classificadas de acordo com o tecido de origem, sendo denominada linfóide quando acomete células da linhagem linfóide, ou mielóide, quando acometem células da linhagem mielóide. Podem ainda ser classificadas de acordo com a progressão da doença em agudas, caracterizadas por blastos imaturos em diferentes estágios ou crônicas, com células bem diferenciadas (GUYTON, HALL, 2011).

As leucemias agudas são caracterizadas pela presença de células imaturas (linfoblastos ou mieloblastos), as quais são incapazes de diferenciarem-se nos diversos tipos celulares presentes no sangue, podendo ser também caracterizadas por uma evolução rápida e fatal em pacientes não tratados. A incidência da leucemia linfóide aguda (LLA) é maior em crianças e aumenta com a idade na leucemia mielóide aguda (LMA). As leucemias crônicas estão associadas a uma proliferação excessiva de células linfóides ou mielóides diferenciadas que podem apresentar uma morfologia anormal. As leucemias crônicas atingem mais pacientes adultos e idosos e apresentam uma evolução lenta (BURKE; STARTZEKK, 2008; FADERL; JEHA; KANTARJAM 2003; ROBAK; WIERZBOWSKA, 2009).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), em conjunto com a Sociedade de Hematologia Americana e a Associação Européia de Hematologia, classifica as neoplasias do sistema hematopoético e linfóide. A LLA é subdividida conforme a marcação imunofenotípica em linhagem B (Pró-B, Comum, Pré-B e LLA-B) e linhagem T (Pré-T e LLA-T). Segundo o Grupo Europeu para a Classificação Imunológica das Leucemias (EGIL), os blastos da linhagem B expressam antígenos específicos para anticorpos monoclonais CD19, CD79a e CD22, e os blastos de linhagem T para o anticorpo CD3. Deve-se observar que o antígeno de histocompatibilidade de classe 2 (HLA-DR) é expresso, na grande maioria dos casos, de LLA de linhagem B, independente do grau de maturação da célula, ao passo que na LLA-T a expressão do HLA-DR está relacionada com um imunofenótipo

mais maduro (SZCZEPANSKI et al., 2003).

Estudos tem demonstrado que as leucemias dos mamíferos estão relacionadas em sua maioria com infecções adquiridas, radiação ionizante, agentes quimioterápicos e pesticidas. Os fatores genéticos também possuem importância na eclosão das leucemias, demonstrando alta incidência em indivíduos com defeitos cromossômicos (LORENZI, 2003, RICHARDSON, 2011, GREAVES, 2006, GRAUX, 2011).

As alterações genéticas que levam a uma transformação leucêmica geralmente são provocadas por alterações importantes nos cromossomos. O número de cromossomos no clone leucêmico pode ser subdividido em: alta hiperdiploidia (com mais de 50 cromossomos), baixa hiperdiploidia (com 47 a 50 cromossomos), pseudodiploidia (46 cromossomos com anormalidades estruturais), 25 diploidia (46 cromossomos normais) e hipodiploidia (menos que 46 cromossomos).

Clinicamente, hiperdiploidia com mais de 50 cromossomos está fortemente associada com um bom prognóstico (PLASSCHAERT et al., 2004). A translocação Filadélfia t(9;22) ocorre em células leucêmicas de 3% a 5% das crianças e 15% a 25% dos adultos (PUI & EVANS, 1998). Estudos têm mostrado um aumento na incidência da translocação Filadélfia, com o aumento da idade. A translocação está associada com um mau prognóstico (SECKER-WALKER et al., 1991).

No Brasil, no ano de 2014, foi estimado 5.050 casos novos de leucemia em homens e 4.320 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,20 casos novos a cada 100 mil homens e 4,24 a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, a leucemia em homens é a quinta neoplasia mais frequente na região Norte (3,57/100 mil). Na região Nordeste (4,15/ 100 mil), é o oitavo. Nas regiões Sul (8,13/ 100 mil), Sudeste (5,42/ 100 mil) e Centro-Oeste (4,14/100 mil), ocupa a décima posição. Para as mulheres, é o sétimo mais frequente na região Norte (2,81/100 mil) e o oitavo na região Sul (6,30/100 mil). Na região Nordeste (3,40/100 mil), ocupa a décima posição. Já nas regiões Sudeste (4,50/100 mil) e Centro-Oeste (3,41/100 mil), é o decimal primeira mais frequente (BRASIL, 2014).

### **3.2.1. LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA**

A leucemia linfóide aguda (LLA) é uma desordem maligna causada pela proliferação de progenitores de linfócitos B e T (linfoblastos) derivados da medula óssea que são transportados para o sangue periférico ainda no início do desenvolvimento. Os linfoblastos substituem os elementos normais

da medula óssea gerando uma diminuição da celularidade normal que pode ser manifestada em anemia, trombocitopenia e neutropenia em diferentes graus. Os linfoblastos podem também infiltrar-se em órgãos como fígado, baço, linfonodos, timo, meninges e gônadas (ONCIU, 2009). O sistema nervoso central (SNC) é o local extramedular mais envolvido. Pacientes com infiltração no SNC já no diagnóstico, tanto adultos como crianças, requerem direcionamento adicional do tratamento para o SNC (PLASSCHAERT et al., 2004).

A LLA representa a desordem maligna mais comum na infância com um pico de incidência entre dois a cinco anos. A incidência volta a aumentar após os sessenta anos, com um pior prognóstico clínico. (FADERL; JEHA; KANTARJAM 2003; ROBAK; WIERZBOWSKA, 2009). Enquanto na infância a LLA acomete células progenitoras linfóides, as quais possuem uma capacidade de renovação limitada, na idade adulta acomete células-tronco hematopoiéticas multipotentes, as quais possuem uma capacidade maior de auto-renovação e são mais resistentes à quimioterapia (GREAVES, 1993; GREAVES, 1999).

A LLA apresenta manifestações clínicas primárias não específicas e em função disto podem ser confundidas com outras doenças. Estes sinais e sintomas são: fadiga, febre, palidez e sangramentos constantes. A contagem de sangue total revela geralmente citopenia e a contagem de leucócitos pode revelar tanto leucopenia, leucocitose ou contagem normal dos mesmos. Os pacientes podem ainda apresentar nódulos envolvendo o SNC ou testículos e ainda hepatoesplenomegalia (BURKE; STARTZEKK, 2008).

Os tratamentos das LLA consistem em quimioterapia de indução nos quais o objetivo é induzir a morte celular das células leucêmicas, seguida de uma terapia de consolidação para destruir células residuais e por fim, uma terapia de manutenção (BURKE; STARTZEKK, 2008).

A quimioterapia de indução consiste na morte de mais de 99% das células leucêmicas e restaura a hematopoiese, da mesma forma a saúde do paciente. Nesta fase, a terapia, geralmente inclui a administração de um glicocorticoide, um quimioterápico como a vincristina e um terceiro fármaco como asparaginase ou antraciclina. A adição de ciclofosfamida e o tratamento intensivo com asparaginase é considerada benéfica em pacientes com LLA de célula T e a adição de mesilato de imatinibe aumenta muito as taxas de remissão em pacientes com cromossomo filadélfia (TALPAZ et al., 2006; STOCK, 2010).

Restaurando a hematopoiese, o tratamento é intensificado com a utilização de fármacos para erradicar células leucêmicas residuais e reduzir o

risco de recidiva. Nesta fase são utilizadas altas doses de metotrexato, corticóides, mercaptopurina, vincristina e asparaginase (PUI; EVANS, 2006).

Após a terapia de consolidação é necessária uma terapia de manutenção para evitar recidivas. Embora cerca de dois terços dos casos de LLA em crianças possam ser tratados com somente 12 meses de terapia (TOYODA, 2000), a maioria dos pacientes recebe quimioterapia por cerca de dois anos e meio. Os fármacos mais utilizados nesta fase são a mercaptopurina e o metotrexato (PUI; EVANS, 2006).

A infiltração de células leucêmicas no SNC é o principal obstáculo para a cura (BOSTROM et al., 2003, LANGE et al., 2002) e os fatores de risco relacionados são: imunofenótipo T, hiperleucocitose, anormalidades genéticas e a presença de células leucêmicas no líquido (ARMSTRONG; LOOK 2005, LAZARUS et al., 2006). A irradiação cranial é utilizada em somente 5 a 20% dos pacientes com alto risco de infiltração no SNC devido às complicações envolvidas com esta terapia. O melhor regime é a administração intratecal de quimioterápicos (PUI, 2003).

As taxas de recidivas são de 25% e 50% para crianças e para adultos respectivamente, sendo estas taxas diretamente relacionadas ao imunofenótipo e o subtipo genético envolvido (ONCIU, 2009). Para pacientes que respondem pouco ou não respondem a quimioterapia usual, o transplante de células tronco hematopoiéticas pode ser usado resultando em mais de 80% de cura em crianças. Em contraste com o sucesso obtido nos pacientes pediátricos, o transplante de pacientes adultos não apresenta resultados satisfatórios (PUI; EVANS, 2006; VITALE et al., 2006).

Apesar da taxa de cura da LLA na infância ser favorável, muitos pacientes ainda desenvolvem sérias complicações agudas e tardias em consequência dos efeitos colaterais dos tratamentos. Esses são especialmente severos naqueles pacientes que necessitam de transplante de medula óssea para a cura. Neste sentido justifica-se os esforços que estão sendo realizados para desenvolver novas abordagens de tratamento com o objetivo de melhorar tanto a taxa de cura como a qualidade de vida dos pacientes com LLA (PUI; JEHA, 2007; DILLER, 2011). Adicionalmente, estudos vêm sendo realizados com o objetivo de estudar novos alvos terapêuticos para as leucemias que induzam as células tumorais à morte celular programada e que apresentem melhor eficácia e menos efeitos colaterais (ZHANG et al, 2008; NICHOLSON, 2000; DEBATIN, 2004).

Um exemplo de classe de quimioterápicos bastante utilizada, principalmente na primeira fase do tratamento da LLA, são as antraciclina (TALPAZ et al., 2006), porém, estes fármacos apresentam uma significativa

toxicidade cardíaca. Altas concentrações no pico plasmático estão associadas à cardiopatia congestiva ao longo do tratamento.

Outro exemplo é um nucleosídeo análogo da pirimidina, a citarabina (4-amino-1-beta-D-arabinofuranosil-2-1H-pirimidinona). Este fármaco ao entrar nas células através de proteínas de membranas específicas, conhecidas como os transportadores de nucleosídeos, são metabolizados intracelularmente por quinases específicas resultando em formas ativas di e trifosforilado de citarabina (GALMARINI et al., 2001). A citarabina é um antimetabólito, ciclo celular específico, que destrói as células da fase S da divisão celular além de inibir a DNA polimerase e incorporação de citarabina no DNA e RNA. Apesar da utilização de citarabina em pacientes com leucemia, os índices de cura ainda são considerados baixos, principalmente devido à resistência primária ou adquirida (GILES, et al., 2006; GALMARINI et al., 2008).

Assim, uma das estratégias para diminuição da toxicidade ou resistência aos fármacos é a utilização da nanotecnologia, incorporando essas moléculas em sistemas nanoestruturados. Desta maneira, a liberação do fármaco poderá ser controlada, evitando-se os picos plasmáticos e reduzindo o desenvolvimento de resistência ao fármaco (HALEY; FRENKEL, 2008).

### **3.3. ANÁLOGOS DE PIRIMIDINAS**

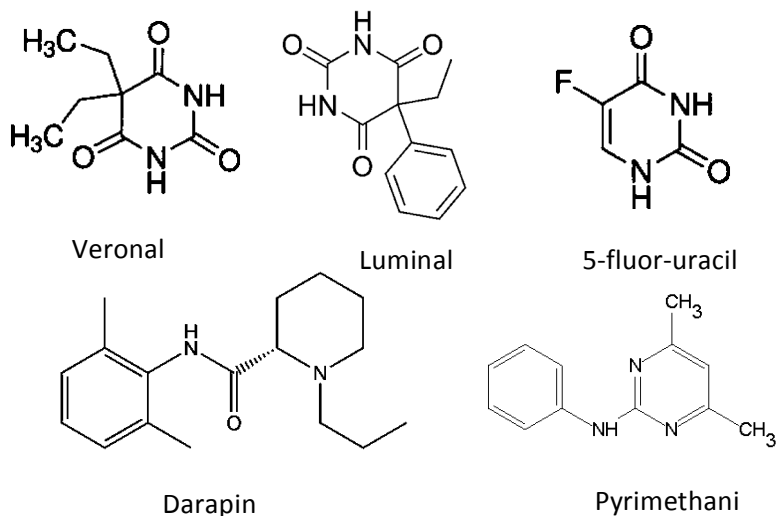
Nos últimos anos tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo síntese de fármacos, que é uma importante etapa da química orgânica, uma vez que permite a síntese de novas moléculas e respectivos análogos.

Compostos heterocícos destacam-se entre fármacos produtos agroquímicos, vitaminas, princípios ativos oriundos de plantas, sendo integrantes de materiais de diversificada aplicabilidade. Extraídos da natureza ou obtidos sinteticamente, os compostos heterocícos são comuns na química orgânica e muitos têm propriedades biológicas definidas. A vitamina B1 (tiamina), o Celecoxib (usado como anti-inflamatório), o Viagra (sildenafil), são alguns exemplos de compostos que possuem anéis heterocícos nas respectivas estruturas.

Entre os sistemas heterocícos, destacam-se as pirimidinas e seus derivados, que atraem o interesse de pesquisadores devido a importância terapêutica e biológica. Isto ocorre principalmente porque estas moléculas estão presentes em organismos vivos e podem fazer parte de moléculas de ácidos nucleicos, como DNA e RNA, os quais são essenciais na biossíntese de proteínas. Esta bioatividade pode ser modificada ou desativada,

dependendo do tipo e da posição dos substituintes. Compostos pirimidínicos têm sido utilizados na medicina como antibióticos, anti-neoplásicos, sedativos, hipnóticos, anticonvulsivos e no tratamento do diabetes (KATRITZKY; REES, 1995).

Como exemplo, podemos citar o derivado pirimidínico 5-hidroximetil-2-metoxi-4-aminopirimidina, isolado a partir do *Bacillus megatherium* que apresentou atividade antimicrobiana a um amplo espectro de fungos e bactérias e atividade anti-carcinogênica em ratos. O Veronal e o Luminal são importantes hipnóticos (ACHESON, 1976), e o Darapin é utilizado como agente antimicrobiano (BROWN, 1984). Como exemplo de derivados pirimidínicos utilizados no tratamento do câncer, destaca-se o antimetabólico 5-fluor-uracil (KANEKO; KATAYAMA, 1988; LEDNICER, MITSCHER, 1988). Pirimidinas sulfonamidas, por sua vez, foram muito usadas como antimicrobianos (KATRITZKY; REES, 1995). Pirimidinas também estão sendo amplamente utilizadas na agricultura como inseticidas e fungicidas. Entre vários exemplos, podemos citar o Pyrimethanil e o Pirimicarb (KATRITZKY; REES, 1995).



**Figura 1.** Estruturas químicas de fármacos pirimidínicos.

Estudos *in vivo* e *in vitro* relatam inúmeras atividades farmacológicas a esta classe de compostos como: atividade antineoplásica (TANGEDA, GARLAPATI, 2010); indutora de interferon (VROEGOP et al, 1999);

antiviral (SALADINO et al., 2002); anti-hipertensiva (SALIMBENI et al., 1995); anti-histamínica (TEMPLE et al., 1979); hipoglicêmica (MADHAVAN et al., 2002); anticonvulsivante (WHITE, et al, 2004); e anti-inflamatória (SANTAGATI, et al., 1994).

Existem diferentes metodologias para a síntese de compostos heterocíclcos, os quais podem fornecer diferentes tipos de substituintes no composto formado. Dentro desse contexto, os pesquisadores do Núcleo de Química de Heterociclos (NUQUIMHE) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) vêm desenvolvendo e adaptando rotas sintéticas visando a obtenção de heterocíclcos estrategicamente substituídos com aplicação comprovada ou análogos estruturais de compostos com aplicação conhecida que fornecem, ainda, possibilidades de derivatizações para outras estruturas.

### **3.4. VIA DE ADMINISTRAÇÃO PARENTERAL**

Uma das áreas mais promissoras na utilização das nanopartículas é a vetorização de fármacos antineoplásicos, principalmente através de administração parenteral, almejando uma distribuição mais seletiva dos mesmos e, assim, um aumento do índice terapêutico (DATE, NAGARSENKER, 2008; BRUXEL, et al., 2012).

A via de administração parenteral é um das alternativas para administração de fármacos com hidrossolubilidade reduzida, como é o caso de fármacos para o câncer e também com dificuldades de absorção via oral. É também uma via de escolha nos casos de emergência, uma vez que assegura início muito rápido de ação. No entanto, o desenvolvimento de medicamentos destinados a essa via, representa um grande desafio tecnológico levando em consideração o número restrito de excipientes aprovados para a utilização parentérica, devido aos requisitos imprescindíveis, em especial, relacionados à biocompatibilidade. Assim, uma formulação desejável deve considerar a segurança de seus excipientes, além da incorporação do fármaco na dose requerida com estabilidade em função do tempo (DATE, NAGARSENKER, 2008; BRUXEL, et al., 2012).

De acordo com Date e colaboradores (2008), até 40% das novas moléculas químicas descobertas são compostos pouco solúveis ou hidrofóbicos, o que dificulta ainda mais o desenvolvimento de uma forma farmacêutica parenteral. Neste contexto, estratégias são propostas, utilizando cosolventes como o etanol e propilenoglicol, e modificação do pH do veículo. Porém, muitos fármacos são incompatíveis, além da dor no local da injeção e a possibilidade de hemólise dependendo da concentração que são utilizadas na formulação.



Outra alternativa é utilizar óleos para a solubilização de fármacos. Esta abordagem é bem aceita para medicamentos intramusculares de liberação prolongada, porém para a administração endovenosa, soluções oleosas não são viáveis (STRICKEY, 2004). Neste sentido, uma alternativa interessante seria a utilização de nanotecnologia na formulação dos medicamentos.

### 3.5 NANOTECNOLOGIA E O CÂNCER

Muitos estudos vêm evidenciando ensaios clínicos com quimioterápicos incorporados em sistemas de liberação de fármacos como nanopartículas para o tratamento de vários tipos de câncer (ZEISSER-LABOUÈBE et al., 2006; VARGAS et al., 2008; DUAN et al., 2010; GARG et al., 2012).

Nos últimos anos, é cada vez mais evidente que o desenvolvimento de novos fármacos por si só não é suficiente para garantir o progresso na terapia medicamentosa. Promissores resultados de testes *in vitro* são frequentemente acompanhados por resultados desapontadores *in vivo*, devido a inúmeras razões como a baixa absorção, metabolismo rápido, alta toxicidade do fármaco, baixa solubilidade, o que exclui a via parenteral (MEHNERT; MÄDER, 2012).

Uma estratégia promissora para superar estes problemas envolve o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos frequentemente descritos como “*drug delivery systems*”. Nestes sistemas, o destino final do fármaco é determinado principalmente pelas características do sistema de liberação, que pode possibilitar uma liberação controlada e localizada do fármaco de acordo com as necessidades específicas da terapia, independente das características físico-químicas do fármaco incorporado no sistema.

Esta tecnologia de liberação controlada de fármacos oferece inúmeras vantagens quando comparada às tecnologias clássicas, viabilizadas pelas formas farmacêuticas convencionais (AZEVEDO, 2002; MOHANRAJ, CHEN, 2006; RAWAT, 2006), tais como: i) maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco, a partir da degradação da matriz; ii) diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação; iii) natureza e composição dos veículos variada e, ao contrário do que se poderia esperar, não há predomínio de mecanismos de instabilidade e decomposição do fármaco (bio-inativação prematura); iv) administração segura (sem reações inflamatórias locais) e conveniente (menor número de doses); v) direcionamento a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas; vi) tanto substâncias hidrofílicas (de difícil absorção), quanto lipofílicas podem ser incorporadas

aumentando consequentemente a biodisponibilidade de substâncias fracamente solúveis; vii) podem superar a resistência oferecida por algumas barreiras biológicas (GREF et al., 1995; GUPTE; CIFTCI, 2004; YEZHELYEV et al., 2006; SAKATA et al., 2007; WANGA; THANOU, 2010).

A nanotecnologia pode ser definida como uma abordagem técnica envolvida no “*design*” ou planejamento, síntese, caracterização e aplicação de materiais que apresentem pelo menos uma dimensão em escala nanométrica (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007). A nanotecnologia pode ser aplicada em diversas áreas, entre estas destaca-se a vetorização de fármacos e as aplicações no segmento de imagens médicas, auxiliando no diagnóstico e tratamento de pacientes com diversas doenças, particularmente o câncer (KAWASAKI; PLAYER, 2005; MACEWAN; CALLAHAN; CHILKOTI, 2010).

As nanopartículas que possuem superfície hidrofóbica ou negativa, apresentam desvantagem para utilização por via parenteral, devido à rápida remoção da circulação sanguínea, após a administração, pelos fagócitos do sistema mononuclear fagocítico. Isto ocorre principalmente em função das características de superfície das partículas que podem permitir a adsorção de proteínas (opsoninas) facilitando o reconhecimento pelos macrófagos. Assim, as características de superfície das nanopartículas podem ser ajustadas, ou mesmo moduladas, segundo o interesse terapêutico, o alvo de ação, a via de administração e outros fatores, tais como a localização do agente infeccioso que se quer atingir (BOCCA et al., 1998). Tem sido observado que tensoativos não-iônicos como poloxâmeros e polissorbato apresentam propriedades físico-químicas capazes de formar uma barreira estérica na superfície das nanopartículas, diminuindo a interação com as células fagocíticas. Estas partículas modificadas são denominadas de “estericamente estabilizadas” ou nanopartículas de “longa circulação” apresentam a capacidade de permanecer por tempo prolongado na circulação sanguínea, tendo, dessa maneira, uma biodistribuição diferenciada das nanopartículas convencionais. (AVGOUSTAKIS, 2004; KUO, SHIH-HUANG et al, 2014).

O tamanho da partícula e a distribuição granulométrica (índice de polidispersão) são análises fundamentais para a utilização de nanopartículas de uso parenteral. Esta análise está diretamente relacionada à segurança de uso da formulação, uma vez que a presença de partículas micrométricas aumenta o risco de embolia, bem como à estabilidade do sistema. Em geral, nanopartículas com os menores diâmetros, de até aproximadamente 500 nm, tendem a ser mais seguras para o uso parenteral e partículas menores que 200

nm não são fagocitadas (DATE, NAGARSENKER, 2008; MERISKO-LIVERSIDGE, LIVERSIDGE, 2011; BRUXEL, et al., 2012).

Além disso, Lee e colaboradores constataram que sistemas nanoestruturados são menos dolorosos para a injeção, em comparação com as formulações à base de cosolventes (LEE et al., 2002). Estes sistemas também têm mostrado que a encapsulação pode reduzir a potencial toxicidade de alguns fármacos como a anfotericina B (MORENO et al., 2001).

Especialmente para o câncer, um aumento da permeabilidade vascular do tecido tumoral ocorre em decorrência da má formação da neovasculatura dos tecidos tumorais, a qual apresenta lacunas entre as células endoteliais. Este aumento da permeabilidade capilar possibilita o extravasamento de carreadores nanoestruturados de fármacos que apresentam diâmetro entre 10 e 700 nanômetro, fenômeno conhecido como EPR (Enhanced Permeability and Retention) (MATSUMURA, MAEDA, 1986; YEZHELYEV et al., 2006).

A utilização de nanocarreadores com o objetivo de incorporar quimioterápicos consiste em uma excelente estratégia quando se trata de moléculas que apresentam baixa solubilidade e fármacos com curto tempo de meia-vida plasmática (BRIGGER; DUBERNET; COUVREUR, 2002; YEZHELYEV et al., 2006; SHALVIRI et al., 2012; HEIDARI et al., 2013).

Além disso, sabe-se que fármacos quimioterápicos apresentam baixa capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e esta característica é o principal obstáculo para a cura de muitos tumores. Em especial, na leucemia linfóide aguda (LLA), além das vantagens acima citadas, a utilização destes sistemas carreadores pode contribuir para o aumento da biodisponibilidade de fármacos no SNC. Como o SNC é o local extramedular mais envolvido na LLA, a utilização de um nanocarreador constitui uma importante estratégia terapêutica (BOSTROM et al., 2003).

Do ponto de vista farmacêutico, e considerando as dimensões, nanocarreadores são estruturas cujo tamanho está compreendido entre 1 a 1000 nm (SHEGOKAR; MÜLLER, 2010). Estas estruturas podem ser preparadas por diferentes métodos e possuir diferentes constituições, incluindo materiais biodegradáveis como polímeros naturais ou sintéticos, lipídeos ou fosfolipídeos e, em alguns casos, compostos organometálicos. Há diferentes tipos de nanocarreadores tais como nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas, nanopartículas metálicas, dendrímeros, bem como diferentes tipos de aplicações para estes sistemas (TORCHILIN, 2001; HUGHES, 2005; RAWAT, 2006; AMIJI, 2007; PARK, 2007; KIM, 2007; JABR-MILANE et al, 2008; KUMARI, YADAV, 2010; DANHIER et al,

2012; MITTAL, CHISTI, BANERJEE., 2013; RAVINDRAN, CHANDRAN, KHAN, 2013; KANGO, 2013).

Nanopartículas lipídicas são preparadas à base de materiais lipídicos, que apresentam a grande vantagem de serem biodegradáveis e de composição muito semelhante à fisiológica, sendo os materiais mais prováveis de apresentarem biocompatibilidade associada a uma reduzida toxicidade crônica e aguda.

A classificação das preparações de nanopartículas lipídicas consiste em: i) nanoemulsões (quando o lipídeo utilizado é líquido em temperatura ambiente); ii) nanopartículas estruturadas (quando há uma mistura de lipídeo líquido com lipídeo sólido) e iii) nanopartículas lipídicas sólidas (quando o lipídeo é sólido em temperatura ambiente) (WISSING; KAISER; MÜLLER, 2004).

As nanopartículas lipídicas foram introduzidas nos anos 50 em produtos de nutrição parenteral. Nos últimos anos, este tipo de carreador está sendo utilizado para incorporar fármacos lipofílicos como por exemplo o diazepam, vendido como Diazepam-Lipuro® injetável, para aplicação intravenosa e intramuscular (MEHNERT E MADER, 2012).

### **3.4.1. NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS**

Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são sistemas de liberação de fármacos, como o próprio nome diz, de tamanho nanométrico, cuja matriz é formada por lipídeos sólidos à temperatura ambiente e corporal. Estas características combinam as vantagens dos sistemas tradicionais, como os lipossomas, as partículas poliméricas e as emulsões, além de minimizar alguns dos inconvenientes inerentes a estes sistemas (JOSHI; MÜLLER, 2009).

NLS são derivadas das emulsões para nutrição parenteral e, diferentemente dessas emulsões que são normalmente estabilizadas com lecitina, podem ser estabilizadas com outros tensoativos ou polímeros. O diâmetro médio pode variar de aproximadamente 50 a 1000 nm (MÜLLER et al., 2000). Experimentos utilizando diferentes tipos de nanopartículas sugerem que, para que ocorra o extravasamento dentro de um tumor, o tamanho do nanocarreador deve ser aproximadamente 400 nm, mas outros estudos têm mostrado que partículas com tamanho médio inferior a 200 nm são mais efetivos (PEER et al., 2007).

Geralmente as NLS são sistemas interessantes para incorporação de fármacos lipofílicos, no entanto, podem ser também utilizadas para a incorporação de fármacos hidrofílicos. Comparadas aos outros sistemas

particulados, as NLS apresentam algumas vantagens, como boa tolerabilidade e biodegradação, alta biodisponibilidade, liberação sustentada ou modulada devido à matriz sólida utilizada, além da habilidade de prevenir a degradação química, fotoquímica ou oxidativa do fármaco. As NLS usualmente estão constituídas de ingredientes bem tolerados fisiologicamente e aprovados para aplicações farmacêuticas em humanos, apresentado 10 – 100 vezes menos toxicidade do que as partículas poliméricas (CAVALLI et al., 1997; PEDERSEN et al., 2006). Adicionalmente, a produção de NLS é facilmente transponível para a escala industrial com baixo custo e sem a utilização de solventes orgânicos (MÜLLER et al., 2000; JOSHI, HUANG et al., 2008; JOSHI, MÜLLER, 2009).

Por outro lado, alguns problemas devem ser ressaltados, como a limitada eficiência de encapsulação pela utilização de um único lipídeo, que pode dificultar a entrada do fármaco entre as cadeias lipídicas e a expulsão do fármaco da matriz lipídica devido às transformações polimórficas do lipídeo durante a estocagem (BUNJES; WESTESEN; KOCH, 1996; WISSING; KAISER; MÜLLER, 2004; MEHNER; MÄDER, 2012).

Os lipídeos mais utilizados na obtenção de NLS são triglicerídeos (tripalmitina), glicídeos parciais (monoestearato de glicerila), ácidos graxos (ácido esteárico), esteróis (colesterol) e ceras (cetilpalmitato). São utilizados também diversos emulsificantes e polímeros, como os sais biliares (taurodeoxicolato, lecitinas e copolímeros do polioxidoetileno e polioxidopropileno (poloxamer), polissorbatos para evitar a agregação das partículas e estabilizá-las (HUO, ZHOU, 2007; FANG et al., 2008; MÜLLER et al., 2008; KHERADMANDNIA et al., 2010; MARTINS et al., 2012).

### **3.4.1.1. TÉCNICAS DE PREPARO DE NLS**

Uma das maiores vantagens da utilização de NLS é o reduzido custo na produção industrial. Existem muitos métodos para produção das NLS incluindo homogeneização à alta pressão, microemulsão, emulsificação por evaporação de solventes e método de irradiação ultrassônica. Estas técnicas, por sua vez, interferem em diversas características das partículas, como por exemplo, no tamanho, índice de polidispersão e até mesmo na morfologia.

#### **3.4.1.1.1. Técnica de homogeneização em alta pressão**

A técnica de homogeneização em alta pressão foi desenvolvida por MÜLLER e Luck em 1996 (Patente Européia nº 0605497) para a preparação de nanoemulsões para nutrição parenteral em grande escala. Existem

inúmeros equipamentos, de vários tamanhos, preços e capacidades diferentes para tanto. Eles funcionam puxando o líquido em alta pressão (100 – 2000 bar), por um pistão estreito (de escala nanométrica), o qual é acelerado em uma pequena distância a uma alta velocidade (acima de 1000 Km/h). Este fluido é, portanto, submetido a um grande estresse, em que forças de cavitação rompem as gotículas, gerando as nanogotículas.

A influência do tipo de homogeneizador, da pressão aplicada, do número de ciclos empregados e da temperatura no tamanho das partículas obtidas tem sido exaustivamente estudada. Com esta técnica é possível trabalhar com concentrações de lipídeo acima de 40% e, geralmente, a distribuição de tamanho das partículas obtidas fica numa faixa estreita (polidispersão inferior a 0,2).

#### 3.4.1.1.2. Técnica de homogeneização por sonda de ultrassom

A técnica de homogeneização por sonda de ultrassom é bastante utilizada na preparação de NLS (WEYENBERG et al., 2007; SILVA et al., 2011; MARTINS et al., 2012; SILVA et al., 2012a; MUSSI et al., 2013). Consiste em um método simples, baseado na quebra da fase interna de uma emulsão pré-formada pela produção de ondas sonoras alternadas de pressões altas e baixas geradas pelo ultrassom (irradiação ultrassônica). Estas ondas sonoras de alta frequência são produzidas por um gerador de ultrassom e convertidas por um transdutor em ondas mecânicas no interior do líquido. Durante a fase de baixa pressão, as bolhas aumentam de tamanho até que atinjam a fase de alta pressão, na qual elas são comprimidas até romperem (HIELSHER, 2005; FREITAS et al., 2006; JAFARI; HE; OUZINEB et al., 2006; BHANDARI, 2007).

A intensidade da radiação ultrassônica é que determina o tamanho das nanopartículas. Quanto maior a intensidade da radiação, menor será o diâmetro da gotícula. Esta diminuição é limitada a um platô, no qual o tamanho dessas gotículas permanece constante (MAA; HSU, 1999; JAFARI; HE; BHANDARI, 2007).

No entanto, este método apresenta algumas desvantagens, como a produção de NLS com dimensões heterogêneas (ELDEM, 1991). Além disso, o uso da sonda de ultrassom é sempre acompanhado por um risco de contaminação por titânio (material da sonda) e pela possibilidade de degradação do ativo, devido à elevada força de cavitação aplicada com aumento da temperatura do sistema. Outra desvantagem é a utilização de baixas concentrações de lipídeo, uma vez que a homogeneização de produtos com viscosidade alta por irradiação ultrassônica é inviável, impossibilitando

a utilização desta técnica (MÜLLER, MADER, GOHLA, 2000; WISSING, KAYSER, MÜLLER, 2004).

#### 3.4.1.1.3. Técnica a partir de microemulsões

A técnica de obtenção de NLS a partir de microemulsões foi desenvolvida por Gasco e colaboradores (1997) e vem sendo modificada por alguns pesquisadores (CAVALLI et al., 1998; LIM; KIM, 2002). De maneira geral, as NLS preparadas com esta técnica são produzidas vertendo-se uma microemulsão (O/A) ainda quente em água gelada, seguido de forte agitação e retirada do excesso de água por liofilização ou ultracentrifugação. A fase interna da microemulsão deve ser composta por lipídeos de baixo ponto de fusão, sendo assim, quando a mesma entra em contato com a água gelada ocorre a formação da NLS.

#### 3.4.1.1.4. Técnica de evaporação do solvente

NLS podem também ser preparadas pelo método de evaporação do solvente desenvolvido por Sjostrom e Bergenstahl (1992). O material lipofílico é dissolvido em um solvente orgânico imiscível em água, por exemplo, o clorofórmio, que é emulsionado numa fase aquosa contendo um emulsionante. Após a evaporação do solvente, geralmente sob pressão reduzida, a dispersão de nanopartículas é formada por precipitação do lipídeo no meio aquoso. A maior desvantagem deste método é o uso de solventes orgânicos (PATIDAR et al., 2010; MEHNERT; MADER, 2012).

### 3.5. MÉTODOS PARA CARACTERIZAÇÃO DE NLS

Assim como para os demais sistemas de liberação de fármacos, a caracterização adequada é uma das etapas mais importantes na pesquisa e desenvolvimento de NLS e o conjunto das informações obtidas por estes estudos são pré-requisito para o sucesso deste tipo de sistema de liberação.

A caracterização das NLS engloba a determinação do tamanho e do potencial zeta da partícula, a avaliação morfológica, a eficiência de encapsulação do fármaco e, ainda, a avaliação da estabilidade em função do tempo e da temperatura de armazenamento.

### 3.5.1. DETERMINAÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA

O método usualmente empregado para a determinação do diâmetro médio e da distribuição do tamanho é o espalhamento dinâmico de Luz (Do inglês, *Dynamic Light Scattering*, DLS), também conhecido como espectroscopia de correlação de fótons. É uma das técnicas mais utilizadas na determinação de tamanhos de nanopartículas em função da praticidade do método, facilidade de operação e velocidade na aquisição dos dados (BOHREN, HUFFMAN, 1983). Este método está baseado na propriedade de partículas em suspensão difundirem em todas as direções e estarem em movimento permanente, o movimento Browniano. Esta movimentação causa o espalhamento do feixe de luz incidente sobre as partículas, possibilitando a determinação do raio hidrodinâmico das mesmas (LIMA, 1995; HOFFMANN et al, 1997; RODRIGUES et al, 2003; SANTOS et al, 2006; JÄGER et al, 2007).

O tamanho médio das partículas e a distribuição de tamanho conhecida como índice de polidispersão (PI) dos sistemas nanocarreadores são parâmetros muito importantes na área de nanotecnologia farmacêutica. No caso do tamanho das NLS, as formulações adequadas devem possuir baixa polidispersividade e tamanho médio menor que 1000 nm. O tamanho das nanopartículas depende de vários fatores incluindo: i) método de preparação; ii) natureza do material utilizado; iii) concentração do lipídeo ; iv) características físico-químicas do fármaco encapsulado; v) concentração de emulsionantes; vi) proporção entre fase oleosa e aquosa; vii) a viscosidade das fases utilizadas; viii) a velocidade de agitação; e ix) velocidade de difusão da fase orgânica na aquosa quando se utiliza solventes (LEGRAND et al., 1999).

O índice de polidispersão pode variar entre zero, quando todas as partículas da dispersão apresentam aproximadamente o mesmo tamanho, e um (1,0), quando o diâmetro médio das partículas é bastante heterogêneo. De uma maneira geral, sistemas nanoestruturados são considerados monodispersos quando o valor de PI é inferior ou igual a 0,2. Especificamente para NLS, devido aos inúmeros fatores envolvidos em sua preparação que afetam o tamanho de partícula, valores de PI mais elevados são considerados adequados.

### 3.5.2. POTENCIAL ZETA ( $\zeta$ )

O potencial zeta reflete o potencial de superfície de partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão



da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (FLORENCE, ATTWOOD, 2003). Geralmente o potencial zeta é calculado por medidas de mobilidade eletroforética que correspondem à velocidade das partículas em suspensão, quando submetidas a um campo elétrico. Quanto maior a carga superficial, maior será a velocidade com que as partículas se deslocam em direção aos eletrodos de carga oposta. Esta velocidade é medida através da técnica de espalhamento de luz.

A medida do potencial zeta permite esclarecimentos sobre a estabilidade da formulação, principalmente durante o período de estocagem. Geralmente, a agregação entre as partículas é menor quando há repulsão eletrostática entre elas. Para garantir a estabilidade, acredita-se que o potencial zeta deva ser superior ao módulo de 30 mV (FREITAS, MÜLLER, 1998, POHLMANN et al, 2002; GREF, COUVREUR, 2006). Porém, esta regra não pode ser aplicada irrestritamente, pois existem algumas formulações com estabilizantes que possuem um potencial zeta menor e nem por isso deixam de ser estáveis (MÜLLER et al., 1996). No caso de um tensoativo não-iônico, a estabilização do sistema ocorre devido ao impedimento estérico e isso faz com que o potencial zeta da formulação apresente valor inferior ao módulo de 30 mV, o que também garante a estabilidade da suspensão. Em geral, as misturas binárias de emulsionantes são muito mais eficazes na estabilização de uma formulação do que quando se utiliza somente um emulsionante (WU, ZHANG, WATANABE, 2011).

### 3.5.3. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

Entre as técnicas microscópicas, a microscopia eletrônica de transmissão (MET do Inglês *Transmission Eletronic Microscopy*) e a microscopia de força atômica (AFM, do Inglês *Atomic Force Microscopy*) têm mostrado serem adequadas na obtenção de imagens diretas de nanopartículas lipídicas, possibilitando a determinação da distribuição de tamanho, além de permitir evidenciar a cristalinidade das estruturas, no caso do uso de microscópios de alta resolução (HOU et al., 2003).

A microscopia por MET consiste em uma técnica na qual um feixe de elétrons é emitido em direção à amostra adequadamente preparada, interagindo enquanto a atravessa. Esta interação entre a amostra e o feixe de elétrons forma uma imagem que é ampliada e focada em um dispositivo de imagem. Essa microscopia é capaz de exibir imagens em alta resolução devido ao pequeno comprimento de onda dos elétrons.

Já a técnica de AFM (microscopia de força atômica) tem sido

bastante empregada para caracterizar a morfologia de superfície das nanopartículas. É a microscopia que fornece informações com alta resolução em três dimensões, em escala nanométrica, sendo possível ainda obter dados com alta resolução de superfície em nível atômico.

O microscópio de força atômica é constituído de uma sonda extremamente fina (~100 Å de diâmetro na extremidade da sonda) montada na extremidade de uma alavanca que varre a superfície da amostra, mantendo uma força pequena e constante entre a sonda e a amostra que faz a alavanca oscilar. Esta técnica permite a avaliação do tamanho das partículas, no entanto, é considerada uma técnica de segunda escolha principalmente para nanocarreadores lipídicos, uma vez que estas se deformam quando depositadas sobre o suporte plano (MONTASSER et al., 2002).

Os modos de operação do AFM mais comuns são o de contato (*contact mode*) e o de contato intermitente (*tapping mode*). No modo contato, a sonda toca continuamente a superfície da amostra, podendo gerar ruídos nas imagens ou imagens distorcidas devido a interações fortes com superfícies mais macias. No entanto com um fino controle da força pode-se obter dados com amostras macias (MUNFORD et al., 2005).

#### **3.5.4. EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO**

Uma das técnicas muito empregadas para determinar a quantidade de fármaco associada às nanopartículas é a ultrafiltração-centrifugação, na qual uma membrana é utilizada para separar a fase aquosa da fase oleosa ou dispersa da suspensão coloidal. A concentração livre do fármaco é determinada no ultrafiltrado e a fração de fármaco associada às nanoestruturas é calculada também pela diferença entre a concentração inserida inicial e livre de fármaco (SCHAFFAZICK et al., 2003; KHERADMANDNIA et al., 2010; KIM, PARK, KIM, 2010; PRIYANKA, ABDUL HASAN, 2012).

#### **3.5.5. ESTABILIDADE QUÍMICA, FÍSICO-QUÍMICA, BIOLÓGICA**

As suspensões coloidais normalmente não possuem tendência à separação de fases durante alguns meses após a preparação, pois o processo de sedimentação é lento para partículas nanométricas, sendo minimizado pelo movimento Browniano. No entanto, existem vários fatores que podem influenciar a estabilidade das suspensões coloidais (aglomeração e sedimentação) como, por exemplo, a adsorção de moléculas ativas às superfícies das nanopartículas, a presença de tensoativos adsorvidos, a

estabilidade química da matriz nanocarreadora utilizada na preparação, entre outros (SCHAFFAZICK et al, 2003; WU, ZHANG, WATANABE, 2011).

A aplicabilidade industrial de nanopartículas dispersas em meio aquoso pode ser limitada devido aos problemas de agregação das partículas, estabilidade química dos ingredientes da formulação e do fármaco. Além disso, é importante ressaltar que formas farmacêuticas líquidas são susceptíveis a contaminação microbiológica. Estes problemas podem ser evitados ou retardados através de operações de desidratação das suspensões de nanopartículas como a liofilização (sublimação) e a nebulização (*spray-drying* ou aspersão) ampliando assim as perspectivas de utilização clínica destes sistemas carreadores de fármacos (POHLMANN et al, 2002; SCHAFFAZICK et al, 2003).

A liofilização, que consiste na remoção da água por meio de sublimação, tem sido amplamente empregada para a secagem de suspensões coloidais (ZIMMERMANN, MÜLLER, MADER, 2000; LI et al., 2008; GUAN et al., 2011; AYEN, KUMAR, 2012). Desta forma, espera-se que o estado sólido dos liofilizados permita uma melhor estabilidade química e física do que dispersões aquosas de lipídeos. No entanto, existem duas transformações adicionais na formulação que são necessárias, que podem originar problemas de instabilidade adicionais. A primeira transformação - a partir de dispersão aquosa de pó - envolve o congelamento da amostra e a sublimação da água sob vácuo. Este congelamento pode causar problemas de estabilidade que resulta em alterações de osmolaridade e pH. A segunda transformação seria a ressolubilização principalmente nos estágios iniciais, situações que favorecem a agregação das partículas (MEHNERT; MÄDER, 2012). Para minimizar esses problemas a adição de crioprotetores é necessária, ajudando a diminuir a agregação de NLS e a obter uma melhor redispersão do produto seco.

Os crioprotetores conferem proteção para as nanopartículas durante o congelamento e são adicionados às suspensões coloidais antes da liofilização para amenizar o estresse do processo nas partículas. Entre os crioprotetores mais comuns mencionados na literatura estão os açúcares tais como glucose, sacarose, manitol, trealose, lactose, polímeros tais como o álcool polivinílico (ABDELWAHED et al., 2006) e a gelatina (SCHWARZ, MEHNERT, 1997; SAEZ et al., 2002; KONAN et al., 2002; VARSHOSAZ et al., 2012).

No caso dos açúcares, o efeito crioprotetor é atribuído à formação de uma matriz amorfa ao redor das nanopartículas, promovendo um espaçamento entre as mesmas, evitando, assim, a agregação durante o congelamento, possibilitando a posterior ressuspensão (SAEZ et al., 2002). Outro mecanismo de proteção conferido pelos crioprotetores envolve a

formação de ligações de hidrogênio entre os açúcares e o grupo polar dos fosfolipídeos ou emulsionantes hidrofílicos, impedindo a agregação das nanopartículas durante o processo de desidratação (CROWE et al., 1996; ALLISON et al., 1998).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

---



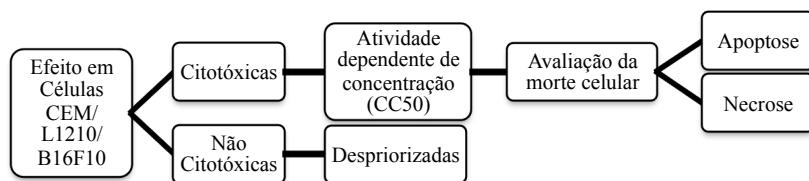
#### **4.1. MATERIAIS**

As linhagens celulares de fibroblasto murina (NIH/3T3 - ATCC CRL-1658), linhagem celular leucêmica linfoblástica de origem murina (L1210), linhagem celular de melanoma de origem murina (B16F10) e linhagem celular leucêmica linfoblástica humana (CEM), foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (Brasil). Os meios de cultura DMEM e RPMI e o soro fetal bovino (SFB) foram adquiridos da Cultilab (São Paulo, Brasil); a penicilina e a estreptomicina foram compradas da Gibco® (Grand Island, NY, EUA); o dimetil sulfoxido (DMSO) foi adquirido da Vetec; o ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), o EGTA,  $MgCl_2$  e o cloreto de potássio (KCl) foram adquiridos da Reagen (Rio de Janeiro, Brasil); O (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), a trealose, o Azul de Tripán, laranja de acridina, brometo de etídeo, bicarbonato de sódio e o (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (HEPES) da Sigma (St. Louis, MO, USA). A Lecitina S75 foi comprada da Lipoid (Brasil), o polissorbato 20, polissorbato 80, propilenoglicol foram adquiridos da Synth (Brasil). O monoestearato de glicerila e o ácido esteárico da Galena (Brasil), tripalmitina da Sasol (Alemanha). Águas purificada e ultra-pura (MilliQ-Milipore, EUA) foram utilizadas. Os análogos de Pirimidina foram gentilmente cedidos pelo professor Nilo Zanatta na UFSM. Os outros reagentes químicos como o etanol e a acetona foram de grau analítico. Solventes utilizados para o desenvolvimento da metodologia analítica grau cromatográfico.

#### **4.2. MÉTODOS**

##### **4.2.1. Avaliação da morte celular dos análogos de pirimidinas**

O estudo sobre os efeitos citotóxicos de análogos de pirimidina foi realizado por meio de ensaio de viabilidade celular (teste do MTT). As moléculas que apresentaram uma maior citotoxicidade foram avaliadas quanto à atividade dependente de concentração e quanto à forma de morte celular, pela técnica de fragmentação do DNA. Resumidamente, este delineamento está descrito na Figura 2.

**Figura 2.** Desenho experimental

#### 4.2.1.1. Síntese das Pirimidinas

Os análogos de pirimidina foram sintetizados pelo grupo de pesquisa do Núcleo de Química de Heterociclos (NUQUIMHE) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) (PACHOLSKI et al. 1990).

As sínteses de análogos nucleosídicos acíclicos foram realizadas pelo método clássico de N-alkilação (haleto de alquila, base, solvente polar) (ZANATTA et al., 2009). A Tabela 1 mostra as estruturas sintetizadas, nomenclatura, fórmula molecular e peso molecular das doze moléculas análogos de pirimidina.

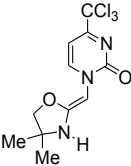
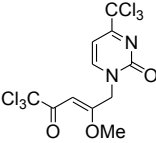
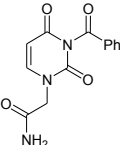
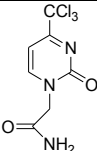
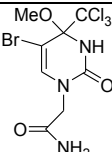
**Tabela 1.** Características dos compostos sintetizados.

| Código         | Estrutura Molécula | Nomenclatura   | Fórmula Molecular   | Massa Molar |
|----------------|--------------------|--|---|-------------|
| A <sub>1</sub> |                    | (Z)-N-metil-3-(metilamino) -4 (2-oxo-4-(triclorometil) pirimidina-1 (2H)-il) but-2-enamida | C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> | 339.61      |
| A <sub>2</sub> |                    | (Z)-N-etil-3-(etilamino) -4 (2-oxo-4-(triclorometilo) pirimidina-1 (2H)-il) but-2-enamida  | C <sub>13</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> | 367.66      |



# *Materiais e Métodos*

|                      |  |   |                          |        |
|----------------------|--|---|--------------------------|--------|
| <b>A<sub>3</sub></b> |  | (Z) -4 (2-oxo-4-(triclorometil)pirimidina-1(2H)-il)-N-propil-3-(propilamino)but-2-enamida                         | $C_{15}H_{21}Cl_3N_4O_2$ | 395.72 |
| <b>A<sub>4</sub></b> |  | (Z)-N-isopropil-3-(isopropilamino) - 4 (2-oxo-4-(triclorometil)pirimidina-1(2H)-il)-but-2-enamida                 | $C_{15}H_{21}Cl_3N_4O_2$ | 395.72 |
| <b>A<sub>5</sub></b> |  | (Z) -4 (2-oxo-4-(triclorometil)pirimidina-1(2H)-il)-N-fenetil-3-(fenetilamino)but-2-enamida                       | $C_{25}H_{25}Cl_3N_4O_2$ | 519.86 |
| <b>A<sub>6</sub></b> |  | (Z) -N- (2-hidroximetil) -3 (amino-2-hidroxietil) -4 (2-oxo-4-(triclorometil)pirimidina-1(2H)-il) but-2-enamida   | $C_{13}H_{17}Cl_3N_4O_4$ | 399.66 |
| <b>C<sub>1</sub></b> |  | (Z) -N- (3-hidroxipropil) -3 (3-hidroxipropilamina) -4 (2-oxo-4-(triclorometil)pirimidina-1(2H)-il) but-2-enamida | $C_{15}H_{21}Cl_3N_4O_4$ | 427.72 |

|                      |  |   |                          |        |
|----------------------|--|---|--------------------------|--------|
| <b>C<sub>2</sub></b> |   | (Z) -1 - ((4,4-dimetiloxazolidin a-2-ilideno) metil) -4 (triclorometil) pirimidina-2 (1H) ona | $C_{11}H_{12}Cl_3N_3O_2$ | 324.59 |
| <b>C<sub>3</sub></b> |   | (Z) -1 (5, 5, 5-tricloro-2-metoxi-4-oxopenteno-2-il) -4- triclorometil-pirimidina-2 (1H) ona  | $C_{11}H_8Cl_6N_2O_3$    | 428.91 |
| <b>B<sub>1</sub></b> |   | 2 (3-benzoil-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidina-1 (2H)-il) acetamida                             | $C_{13}H_{11}N_3O_4$     | 273.25 |
| <b>B<sub>2</sub></b> |   | 2 (2-oxo-4-(triclorometil) pirimidina-1 (2H)-il) acetamida                                    | $C_7H_6Cl_3N_3O_2$       | 270.5  |
| <b>B<sub>3</sub></b> |  | 2 (5-bromo-4-metoxi-2-oxo-4-(triclorometilo) - 3,4-dihidropirimidina-1 (2H)-il) acetamida     | $C_8H_9BrCl_3N_3O_3$     | 381.44 |

#### 4.2.1.2. Cultura Celular

Foram utilizadas as linhagens celulares de leucêmica linfoblástica de origem murina (L1210), de melanoma de origem murina (B16F10) e de célula leucêmica linfoblástica humana (CEM). As células foram mantidas em garrafas plásticas de cultura, contendo meio DMEM ou RPMI, suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 100 U.mL<sup>-1</sup> de penicilina, 100 µg.mL<sup>-1</sup> de estreptomicina, 10 mM HEPES, pH 7.4, em estufa umidificada, a 37 °C e

com 5 % CO<sub>2</sub>. Antes da realização de todos os experimentos, o número de células viáveis foi avaliado pelo método de Azul de Tripán (FRESHNEY, 1987) e a contagem realizada em câmara de Neubauer.

#### **4.2.1.3. Tratamento Celular**

Os compostos foram dissolvidos em uma solução de DMSO e armazenados a 4 °C. Essas soluções estoques foram diluídas em meio de cultura para atingir as concentrações desejadas nos experimentos. As células L1210, CEM e B16F10 foram incubadas com as pirimidinas em placas de 96 poços, por 24 h. Foram utilizados controles de células sem tratamento e com tratamento de DMSO, diluído em meio de cultura, na mesma proporção utilizada para dissolver os compostos. A concentração máxima de DMSO adicionada as células foi de 0,4 %.

#### **4.2.1.4. Ensaio de Viabilidade Celular**

A viabilidade celular foi analisada pelo método do MTT (brometo de dimetiazol difeniltetrazólio) (MOSMANN, 1983). O MTT é um sal tetrazólio de cor amarela, que é reduzido a formazan, de cor azulada, pela atividade oxidativa das células, funcionando como um indicador da função mitocondrial e, por conseguinte, da viabilidade celular.

As células ( $1 \times 10^4$ ) foram incubadas por 24 h, em triplicata, com os compostos em placas de 96 poços. Decorrido o tempo de incubação, o meio de cultura foi retirado e acrescentado uma nova alíquota de meio contendo MTT ( $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), seguido de incubação por 1 h, a 37 °C. O meio de cultura foi retirado e o formazan precipitado foi dissolvido com dimetilsulfóxido e a absorbância medida a 540 nm em um leitor de microplacas (Organon Teknika, Belgium). A densidade óptica, obtida do grupo controle, células sem tratamento, foi considerado como 100 % de células viáveis.

#### **4.2.1.5. Determinação da Curva de Concentração *versus* Resposta**

Para determinar a dependência de concentração *versus* o efeito citotóxico,  $1 \times 10^4$  células foram incubadas por 24 h com as moléculas em concentrações crescentes (0, 5, 10, 20, 30, 40 e 50  $\mu\text{M}$ ). Todas as incubações foram feitas em estufa umidificada, a 37 °C, com 5 % CO<sub>2</sub>, seguido do ensaio do MTT citado no item 4.2.1.4. A CC<sub>50</sub>, concentração citotóxica em 50 % em relação a viabilidade celular foi calculada em 24 h, através das curvas

obtidas.

#### **4.2.1.6. Análise da Apoptose pelo Método de Fragmentação do DNA**

O isolamento de fragmentos apoptóticos do DNA foi realizado seguindo o método de Han (1997). As células ( $3 \times 10^6$ ) foram tratadas com as pirimidina nas concentrações das  $CC_{50}$  para cada substância, em placas de 6 poços e mantidas por 24 h a 37 °C, com 5 % de  $CO_2$ . As células foram lavadas com PBS e posteriormente lisadas com tampão de lise (10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.0; 0,25 % NP-40, 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> proteinase K) a 50 °C, por 2 h. O DNA foi precipitado com 2,5 vol de etanol-NaCl *overnight*, a - 20 °C. As amostras foram, então, centrifugadas a 11000 x g por 30 min. O material decantado foi lavado com etanol a 70 %, seco à temperatura ambiente, dissolvido em tampão (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 0,1 mM EDTA, 0,6 g.mL<sup>-1</sup> de RNase A) e incubado a 37 °C, por 1 h. A concentração do DNA extraído de cada amostra foi determinada por espectroscopia (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). As amostras foram diluídas 1:100 em água destilada; a absorbância foi medida em 260 nm.

A fragmentação do DNA foi analisada por eletroforese, em gel de agarose a 1%, e corado com brometo de etídio. A corrida foi realizada a 150 V e 200 mA, por 40 min em tampão TAE (Tris - ácido acético – EDTA). Foram aplicados 2 µg de DNA de cada amostra. Os géis foram fotografados sob iluminação ultravioleta de 320 nm (Hoefer-MacroVue UV-20), utilizando-se um sistema de fotodocumentação de géis (Doc- Print®).

#### **4.2.2. Avaliação da influência dos componentes de formulação sobre as propriedades e biocompatibilidade de NLS**

##### **4.2.2.1. Preparação das nanopartículas lipídicas sólidas**

As formulações foram obtidas pelo método de ultrassom (PATIL, 2007). Para a preparação das nanopartículas, a fase lipídica composta pelo lipídeo (ácido esteárico ou tripalmitina ou monoestearato de glicerila), emulsificante lipofílico (Lecitina S75) e solução solvente (50:50 v/v etanol e acetona) foi aquecida a 75 °C. Em seguida, a fase aquosa composta de solução tampão fosfato salino (PBS) acrescida do tensoativo hidrofílico (Polissorbato 80), previamente aquecida na mesma temperatura, foi vertida na fase oleosa sob agitação. Essa emulsão pré-formada foi submetida à irradiação ultrassônica (Vibracells, USA) por 3 min com uma amplitude de

70 % sob banho de gelo com o auxílio de uma ponta de ultrassom (6 mm de diâmetro) formando as nanopartículas.

#### **4.2.2.2. Caracterização do tamanho, polidispersão e potencial zeta**

O tamanho médio de partículas, a distribuição e o potencial zeta foram determinados por espalhamento de luz dinâmico e anemometria laser Doppler, respectivamente, utilizando um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK), equipado com ângulo de espalhamento de 173 °. As medidas foram realizadas a 25 °C após diluição 1:50 das amostras em água destilada previamente filtrada. A distribuição de tamanho de partículas é dada pelo índice de polidispersidade (PI). Para medir o potencial zeta, amostras de nanopartículas foram colocadas em uma célula específica quando um potencial de  $\pm 150$  mV foi estabelecido. Os valores de potenciais foram calculados a partir dos valores da média de mobilidade eletroforética, através da equação de Smoluchowski.

#### **4.2.2.3. Morfologia – Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

Para avaliar a morfologia da formulação otimizada de NLS foi utilizada microscopia eletrônica de transmissão. Para isso a formulação foi diluída em água purificada (1:10) e depositada sobre um grid de metal de cobre revestido com carbono (CF200-Cu, 300 mesh de cobre, EMS, Hatfield, PA, EUA). O grid contendo a amostra foi armazenado a temperatura ambiente durante 24 h. As nanopartículas foram visualizadas em um aumento de 100.000 vezes ou superior em um modelo MET JEM-1011 (JEOL, Peabody, MA, EUA).

#### **4.2.2.4. Estudo de Estabilidade**

As formulações foram armazenadas sob refrigeração (4 °C) e ambiente (23 °C) por 60 dias e avaliadas quanto às propriedades físico-químicas como: tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta em tempos pré-determinados (0, 30, 60 dias).

#### **4.2.2.5. Estudo de Biocompatibilidade Celular**

Para este estudo foi utilizada a linhagem celular de fibroblasto de origem murina (NIH/3T3) As células foram mantidas conforme citado no item 2.2.1.2. As nanopartículas utilizadas em cada ensaio foram mantidas em

banho a 37 °C por 30 min antes da utilização. As células ( $1 \times 10^4$ ) foram incubadas com as NLS em placas 96 poços em concentrações crescentes (50 a 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A incubação foi realizada em estufa umidificada, a 37 °C, com 5 %  $\text{CO}_2$  seguido do ensaio do MTT conforme item 2.2.1.4. A  $\text{CC}_{50}$ , concentração citotóxica em 50% em relação a viabilidade celular foi calculada em 24 h, através das curvas obtidas.

#### 4.2.2.6. Análise do ciclo celular

O ciclo celular das células tratadas foi analisado por citometria de fluxo, de acordo com o método proposto por Yang e colaboradores (2007). Resumidamente, as células ( $1 \times 10^6$  / poço) foram cultivadas numa placa de 12 poços durante 24 h. O meio foi então substituído e as formulações foram adicionadas na concentração citotóxica ( $\text{CC}_{50}$ ) e incubadas por 24 h. Em seguida, as células foram centrifugadas e lavadas com PBS e novamente centrifugadas. O sobrenadante foi removido e as células foram fixadas com etanol a 70 % durante 30 min a 4 ° C. Depois disso, PBS com 2% de BSA foi adicionado e centrifugado. Os sobrenadantes foram removidos e as células foram permeabilizadas com tampão de lise (0,1 % de Triton-X em PBS) e 0,5  $\mu\text{L}$  de RNase ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). O conteúdo de DNA foi marcado com iodeto de propídio ( $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e analisado utilizando um citômetro de fluxo FACS Canto (Becton Dickinson). A população de células em cada fase do ciclo celular foi determinada utilizando o *software* WinMDI 2,9.

#### 4.2.2.7. Identificação do tipo de morte celular

A identificação de apoptose ou necrose foi realizada por um ensaio de dupla marcação com laranja de acridina (3,6-dimethylaminoacridine) e brometo de etídio (3,8-diamino-5-etil-6-phenylphenanthridinium brometo) (COHEN, 1993). Para isso, a  $1 \times 10^6$  células / poço foram cultivadas em placas de 12 poços e as formulações foram incubadas por 24 h de acordo com as concentrações de  $\text{CC}_{50}$ . O meio foi então removido e as células foram lavadas com PBS, seguindo-se a dupla coloração com laranja de acridina e brometo de etídio. As imagens foram visualizadas com o microscópio de fluorescência (Nikon, Eclipse TS100). As imagens foram obtidas em 200 X de ampliação e analisadas pelo *software* Image J para avaliação das alterações morfológicas e identificação do tipo de morte celular. Deste modo: (a) as células viáveis apresentam núcleo verde com estrutura intacta; (b) células com núcleo brilhante verde e condensação da cromatina (início de apoptose), além de áreas de laranja densas de condensação da cromatina

(apoptose tardia) foram considerados apoptose; e (c) as células que apresentam coloração laranja e núcleo intacto representam necrose secundária.

#### **4.2.2.8. Determinação da Hemólise**

A hemólise foi avaliada segundo condições descritas por Wang e colaboradores (2009). Amostras de sangue de indivíduos saudáveis foram obtidas por venopunção em tubos contendo citrato de sódio. Os eritrócitos foram separados por centrifugação a 2000 x g por 5 min e lavados 3 vezes com solução salina. Os eritrócitos correspondentes a 1 mL de sangue foram re-suspensos em 10 mL de solução salina. Cerca de 8 % (v/v) das formulações de NLS foram adicionadas à solução salina contendo os eritrócitos em suspensão. Após incubação a 37 °C por 1 h sob agitação, as amostras foram centrifugadas. O sobrenadante foi retirado e foram adicionados 500 µL de diclorometano para separar a fase lipídica das nanopartículas que causam turbidez ao hemolisado. As amostras foram novamente centrifugadas e a absorbância da fase aquosa foi medida em 415 nm. Como controle positivo foi adicionado 1,25 mL de água à suspensão de eritrócitos. O controle positivo foi considerado 100 % de hemólise.

#### **4.2.3. Aplicação de delineamento experimental para otimizar uma formulação**

##### **4.2.3.1. Condições do delineamento experimental**

O delineamento experimental foi obtido com auxílio do *software* Design-Expert<sup>®</sup> (8.0.7.1, Stat-Ease, EUA). Um estudo do tipo metodologia de superfície de resposta com processamento em algoritmo *D-optimal* foi utilizado para gerar as combinações representativas dos fatores (numéricos e categóricos), selecionados a partir de um estudo preliminar (dados não mostrados). Para cada variável independente, estabeleceram-se três níveis descritos como mínimo, intermediário e máximo (Tabela 2).

**Tabela 2.** Variáveis independentes numéricas e categóricas e seus respectivos níveis

| Variável                    | Tipo       | Níveis             |               |                                  |
|-----------------------------|------------|--------------------|---------------|----------------------------------|
|                             |            | Mínimo             | Intermediário | Máximo                           |
| <b>(A)</b> Emulsionante (%) | Numérica   | 1,00               | 1,25          | 1,50                             |
| <b>(B)</b> Lipídeo (mg)     | Numérica   | 200                | 250           | 300                              |
| <b>(C)</b> Solvente (mL)    | Numérica   | 0,2                | 0,30          | 0,4                              |
| <b>(D)</b> Tipo de Lipídeo  | Categórica | Tripalmitina (TRP) | -             | Monoestearato de Glicerila (MEG) |

#### 4.2.3.2. Preparação das nanopartículas lipídicas sólidas

As formulações foram obtidas pelo método de ultrassom (PATIL, 2007) conforme metodologia descrita no item 4.2.2.1.

#### 4.2.3.3. Caracterização das NLS

O tamanho médio de partículas, a distribuição e o potencial zeta foram determinados por espalhamento de luz dinâmico e anemometria laser Doppler, respectivamente, utilizando um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK), conforme metodologia descrita no item 4.2.2.2.

Para avaliar a morfologia da formulação otimizada de NLS foi utilizada microscopia eletrônica de transmissão conforme metodologia descrita no item 4.2.2.3.

#### 4.2.3.4. Estudo de Estabilidade

A formulação otimizada foi armazenada sob refrigeração (4 °C) por 180 dias e avaliada quanto aos aspectos físico-químicos como: tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta em tempos pré-determinados (0, 7, 15, 30, 60, 90 e 180 dias).



#### **4.2.3.5. Estudo de Biocompatibilidde: Ensaio de MTT**

Estudo realizado utilizando a linhagem celular NIH-3T3. As nanopartículas utilizadas em cada ensaio foram mantidas em banho a 37 °C por 30 min antes da utilização. As células foram incubadas com as NLS em placas 96 poços em concentrações crescentes (0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 µg.mL<sup>-1</sup>). A incubação foi realizada em estufa umidificada, a 37 °C, com 5 % CO<sub>2</sub> seguido do ensaio do MTT descrito no item 4.2.1.4.

#### **4.2.3.6. Determinação da Hemólise**

A hemólise foi avaliada segundo condições descritas por Wang e colaboradores (2009). Esta metodologia foi descrita no item 4.2.2.8. Para este estudo cerca de 8 % (v/v) da formulação otimizada de NLS foi adicionada à solução salina contendo os eritrócitos em suspensão.

#### **4.2.4. Desenvolvimento e validação do método de doseamento da molécula C<sub>3</sub> nas NLS**

##### **4.2.4.1. Determinação do comprimento de onda de absorção máxima do C<sub>3</sub>**

Foi realizada uma varredura de espectros de absorbância no intervalo de comprimento de onda de 200 a 400 nm de uma solução de C<sub>3</sub> em acetonitrila para verificar o comprimento da maior absorbância da molécula.

##### **4.2.4.2. Condições cromatográficas**

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Perkin Elmer S 200 composto por uma bomba binária, um controlador automático de fluxo, um injetor automático (com alça dosadora de até 200 µL), um detector espectrofotométrico UV/VIS e um desgaseificador. Foi utilizada uma coluna Zorbax ODS (5 µm – 150 mm x 4,6 mm i.d.). A fase móvel foi constituída de uma mistura de acetonitrila:água (65:35, v/v). Essa solução foi desgaseificada e filtrada. As condições de operação foram em modo isocrático, com fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, detecção de 270 nm e volume de injeção de 20 µL, à temperatura ambiente.

A concentração do análogo de pirimidina nas amostras foi estimada por CLAE utilizando o programa TOTALCHROM, através da medida da área dos picos detectados.

**4.2.4.3. Linearidade**

A linearidade foi avaliada através da construção de três curvas de calibração, em diferentes dias, contemplando concentrações de 0,5 a 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A partir de uma solução estoque do análogo da pirimidina ( $\text{C}_3$ ) a 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  foram preparadas diluições de 5,0, 7,5, 15, 25 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  utilizando a fase móvel como diluente. A equação da reta foi determinada através de regressão linear.

**4.2.4.4. Especificidade**

Amostras de NLS brancas, previamente dissolvidas na fase móvel posteriormente filtradas em membrana de filtração 0,45  $\mu\text{m}$ , foram injetadas no cromatógrafo a fim de garantir que os componentes das NLS não interferem na detecção e quantificação do análogo de pirimidina.

**4.2.4.5. Exatidão**

A exatidão foi avaliada através de um teste de recuperação. NLS brancas foram contaminadas com concentrações conhecidas de análogo de pirimidina: 7,5, 15 e 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Essas amostras foram dissolvidas em fase móvel e filtradas em membrana de filtração 0,45  $\mu\text{m}$ . Foram injetadas em triplicata amostras de NLS, as NLS contaminadas e a solução do análogo de pirimidina 7,5, 15 e 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . As porcentagens de recuperação foram calculadas conforme a Equação 1:

(1)

$$R\% = \frac{\text{CNC} - \text{B NC}}{\text{S C}_3} \times 100$$

Onde:

R % = porcentagem de recuperação

$\text{C}_{\text{NC}}$  = nanopartículas contaminadas

$\text{B}_{\text{NC}}$  = nanopartículas brancas

$\text{S}_{\text{C}_3}$  = soluções de  $\text{C}_3$

**4.2.4.6. Precisão**

A repetibilidade do método foi avaliada através da análise de seis amostras de NLS contendo 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de análogo de pirimidina em um

mesmo dia. A precisão intermediária, por sua vez, foi determinada pela análise de seis amostras na mesma concentração realizadas em três dias distintos. A precisão foi expressa através dos desvios padrões relativos obtidos.

#### 4.2.4.7. Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD)

O LQ e LD foram calculados através das fórmulas matemáticas preconizadas pelo *International Conference on Harmonisation* (ICH) (2005), sendo utilizados os valores de desvio padrão e de inclinação das curvas de calibração construídas no item linearidade. O LQ e LD foram ser expressos pelas equações 2 e 3:

(2)

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC}$$

(3)

$$LD = \frac{DP \times 3,3}{IC}$$

Onde:

LQ = limite de quantificação

LD= limite de detecção

DP = desvio padrão do intercepto com o eixo de Y

IC = inclinação da curva de calibração

#### 4.2.5. Incorporação da molécula C<sub>3</sub> em NLS

##### 4.2.5.1. Preparação da NLS

As formulações foram obtidas pelo método de ultrassom (PATIL., 2007) conforme descrito no item 4.2.2.1. Para a preparação das nanopartículas, o lipídeo utilizado para o núcleo da NLS foi a Tripalmitina.

A composição quali-quantitativa das formulações encontra-se na Tabela 3.

**Tabela 3.** Composição (% p/v) das NLS

|               | Tensoativo<br>lipofílico<br>(%) | Tensoativo<br>Hidrofílico<br>(%) | Lípido<br>(%) | Solvente<br>(%) | Quantidade<br>de C <sub>3</sub> (µg.mL) |
|---------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------|-----------------|---|
| <b>Branca</b> | 0,27                            | 1,23                             | 2,22          | 3,0             | 0,00                                    |
| <b>250</b>    | 0,27                            | 1,23                             | 2,22          | 3,0             | 250                                     |
| <b>500</b>    | 0,27                            | 1,23                             | 2,22          | 3,0             | 500                                     |
| <b>1000</b>   | 0,27                            | 1,23                             | 2,22          | 3,0             | 1000                                    |

\*Fase aquosa composta por tampão PBS

#### 4.2.5.2. Caracterização do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta

O tamanho médio de partículas, a distribuição e o potencial zeta foram determinados por espalhamento de luz dinâmico e anemometria laser Doppler, respectivamente, utilizando um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK), conforme descrito no item 4.2.2.2.

#### 4.2.5.3. Eficiência de encapsulação

Aliquotas de 500 µL das NLS (n=3) foram transferidas para unidades de ultrafiltração/centrifugação (Ultrafree-MC 100000 NMWL; Milipore, EUA) e centrifugadas a 2000 x g por 20 min. Após a separação, 20 µL do filtrado (não encapsulado) foi retirado e diluído em 120 µL de acetonitrila para determinação da eficiência de encapsulação. As amostras foram analisadas por CLAE, conforme condições cromatográficas previamente desenvolvida e validada. A eficiência de encapsulação foi calculada como sendo a diferença percentual entre a quantidade de fármaco presente na suspensão (concentração total) e aquela encontrada no filtrado (C<sub>3</sub> não encapsulado), empregando-se a Equação 4:

$$EE\% = CT \frac{(CF \times 100)}{CT} \quad (4)$$

Em que:

CT = Concentração total de pirimidina

CF = Concentração de pirimidina no filtrado

#### 4.2.5.4. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

O comportamento térmico da tripalmitina, C<sub>3</sub>, nanopartícula branca e C<sub>3</sub> incorporado na NLS em diferentes concentrações (250, 500 e 1000 µg.mL<sup>-1</sup>) foram analisados por DSC. As amostras foram previamente liofilizadas para realização deste experimento.

As análises de DSC foram realizadas em equipamento DSC-60 Shimadzu (Kyoto, Japão). Cerca de 2,0 mg de amostra foram pesados em cadinhos de alumínio, os quais foram selados e submetidos ao aquecimento numa razão de 10 °C.min<sup>-1</sup> até 250 °C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min<sup>-1</sup>. Como referência foi utilizado um cadinho equivalente vazio.

#### 4.2.5.5. Validação do método de liberação *in vitro*

Para garantir a confiabilidade dos resultados do estudo de liberação *in vitro*, alguns parâmetros de validação foram analisados conforme descrito abaixo.

##### 4.2.5.5.1. Condições cromatográficas

As análises foram realizadas conforme condições descritas no item 4.2.4.2.

##### 4.2.5.5.2. Determinação da solubilidade do C<sub>3</sub> em diferentes meios de dissolução

Para a escolha do meio de liberação, a solubilidade do C<sub>3</sub> foi estimada com diferentes meios. Dez mililitros de cada meio a ser testado e um excesso da molécula foram adicionados em um frasco de vidro âmbar, obtendo-se uma suspensão. Os frascos foram mantidos em agitação por 24 horas com temperatura controlada de 37 °C. O conteúdo dos frascos foi centrifugado e 200 µL do sobrenadante acrescidos de 200 µL de acetonitrila foram injetados no cromatógrafo.

##### 4.2.5.5.3. Linearidade

Para quantificar o C<sub>3</sub> liberado das NLS, uma curva de calibração foi construída com a faixa de concentração de 0,5 a 15 µg.mL<sup>-1</sup>. As diluições

foram preparadas utilizando o meio de liberação como diluente. A equação da reta foi determinada através de regressão linear.

#### **4.2.5.5.4. Especificidade frente à composição do meio de liberação**

Uma alíquota do meio de liberação foi injetada em triplicata no cromatógrafo a fim de garantir que a presença dos componentes do mesmo não interfere na detecção e quantificação da molécula C<sub>3</sub>.

#### **4.2.5.5.5. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)**

O LD e LQ foram calculados através da fórmulas matemáticas preconizadas pelo ICH (2005), demonstradas no item 4.2.4.7, sendo utilizados os valores de desvio padrão e de inclinação das curvas de calibração construídas.

#### **4.2.5.6. Estudo de Liberação**

A liberação *in vitro* da pirimidina a partir das NLS foi avaliada por 24 h. Nos tempos determinados (0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 h) foram retirados 200 µL do meio de dissolução. As amostras foram transferidas para unidades de ultrafiltração/centrifugação (Ultrafree-MC 100000 NMWL; Milipore, EUA) e centrifugadas a 2000 x g por 20 min. Após a separação, 100 µL do filtrado foi retirado e diluído em 100 µL de acetonitrila para determinação da liberação do C<sub>3</sub> da NLS. As amostras foram analisadas por CLAE, conforme condições cromatográficas previamente desenvolvidas e validadas (conforme descrito no item 4.2.4.2).

#### **4.2.5.7. Estudo de Estabilidade**

As formulações, não liofilizadas, foram armazenadas em *vials* sob condição ambiente (23 ± 3 °C) por 90 dias e avaliadas quanto aos aspectos físico-químicos como: tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta, EE % e concentração total de C<sub>3</sub> nos tempos de 0, 30, 60 e 90 dias.

O teor de C<sub>3</sub> obtido a cada tempo analisado foi comparado com a formulação de NLS liofilizada com o mesmo tempo de exposição. As NLS foram armazenadas em frasco de 20 mL e nos tempos estudados, 10 mL de acetonitrila foram adicionados ao frasco que foi submetido a agitação com auxílio de um vortex até a total dissolução. Em seguida, a dispersão foi

centrifugada e o sobrenadante injetado no cromatógrafo para avaliar o teor de C<sub>3</sub> na formulação.

#### **4.2.5.8. Estudo de Liofilização das formulações**

Para preparação das amostras a serem liofilizadas, 1 mL de suspensão de NLS foi transferido a frascos com capacidade máxima de 20 mL e acrescido de 1 mL de solução contendo trealose em diferentes concentrações para que fossem atingidas concentrações finais de 5, 10 e 15 %. Posteriormente, as formulações foram congeladas por 48 h a - 20 °C seguido de liofilização por 24 h em Liofilizador LD 1500 (Terroni Ltda, Brasil).

#### **4.2.5.9. Ressuspensão das NLS após liofilização**

Para a ressuspensão das NLS foram adicionados 2 mililitros de água purificada em agitação manual por 60 segundos. Estas mesmas formulações, após serem caracterizadas, foram submetidas ao banho de ultrassom durante 5 min e foram novamente caracterizadas.

#### **4.2.5.10. Estudo de Citotoxicidade**

Foi utilizada a linhagem de célula leucêmica linfoblástica de origem murina (L1210), a qual foi mantida conforme descrito no item 2.2.1.2.

As NLS foram mantidas em banho a 37 °C por 30 min antes da utilização. As células foram incubadas com as NLS e/ou com a molécula C<sub>3</sub> livre em placas 96 poços em concentrações crescentes (0, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 µM em função da concentração do C<sub>3</sub> livre ou encapsulado. A incubação foi realizada em estufa umidificada, a 37 °C, com 5 % CO<sub>2</sub> seguido do ensaio do MTT descrito no item 4.2.1.4.

### **4.2.6. Comparação do método de produção de NLS**

#### **4.2.6.1. Preparação das NLS**

##### **4.2.6.1.1. Método de Ultrassom**

Realizado conforme metodologia descrita no item 4.2.2.1.

#### **4.2.6.1.2. Método de Homogeneização por alta pressão**

A metodologia foi executada conforme Müller, Lucks (1996). Para a preparação das nanopartículas, a fase lipídica composta pelo lipídeo tripalmitina, lecitina S75 e solução solvente (50:50 etanol e acetona) foi aquecida a 75 °C. Em seguida, a fase aquosa composta por PBS e polissorbato 80, previamente aquecida na mesma temperatura, foi vertida na fase oleosa sob agitação mecânica. Essa emulsão pré-formada foi passada por 6 ciclos a 700 bar de pressão em um homogeneizador de alta pressão (NIRO SOAVI, Itália) formando as nanopartículas.

#### **4.2.6.2. Caracterização do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta**

O tamanho médio de partículas, a distribuição e o potencial zeta foram determinados por espalhamento de luz dinâmico e anemometria laser Doppler, respectivamente, utilizando um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK), conforme descrito no item 4.2.2.2.

#### **4.2.6.3. Estudo de biocompatibilidade: Ensaio de MTT**

Foi utilizada a mesma metodologia descrita no item 4.2.1.4.

#### **4.2.7. Análise Estatística**

Os experimentos foram realizados em triplicata independentes e os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão ou desvio padrão relativo. Para as comparações entre grupos foi utilizada análise de variância (ANOVA), seguido de pós-teste (Tukey). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando o  $p < 0,05$ . Para comparar as duas técnicas foi aplicado o T test. A análise estatística dos resultados obtidos do delineamento experimental foram realizadas com auxílio do *software Design-Expert*<sup>®</sup>.

Para as análises de cultivo celular os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro-padrão da média (EPM); cada experimento foi realizado em triplicata; para a avaliação estatística, foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA), seguida de Bonferroni ou Dunnett's; um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---



### 5.1. Avaliação da citotoxicidade de análogos de Pirimidina

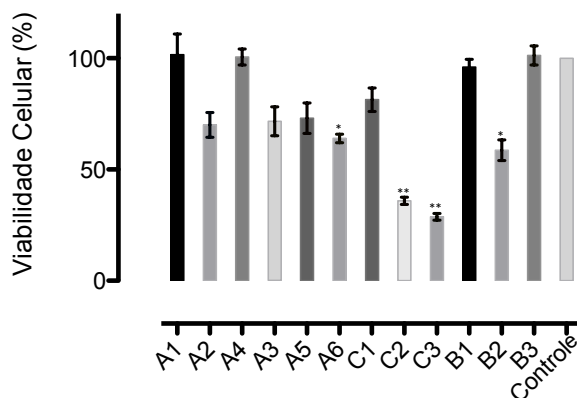
Pirimidinas e purinas têm sido alvos constantes de estudos, devido ao fato de ocorrerem na natureza como componentes dos ácidos nucleicos (DNA e RNA), na forma de derivados de açúcares N-substituídos (GILCHRIST, 1992). Pirimidinas são heterociclos de seis membros que contêm dois átomos de nitrogênio nas posições 1 e 3 do anel. Os nucleosídeos têm sido as estruturas modelo para planejamento racional e desenvolvimento destas novas moléculas (GAMBACORTA et al., 2006).

Um nucleosídeo análogo é uma substância sintética que se assemelha a um nucleosídeo. Por sua particular importância as pirimidinas vêm tendo suas propriedades físicas e químicas extensivamente estudadas. Os nitrogênios dos anéis pirimidínicos são nucleofílicos e podem ser alquilados. A N-alkilação de pirimidinas tem fornecido compostos com propriedades anti-inflamatórias, anti-cancerígenas, antivirais entre outras (ZANATTA et al., 2009).

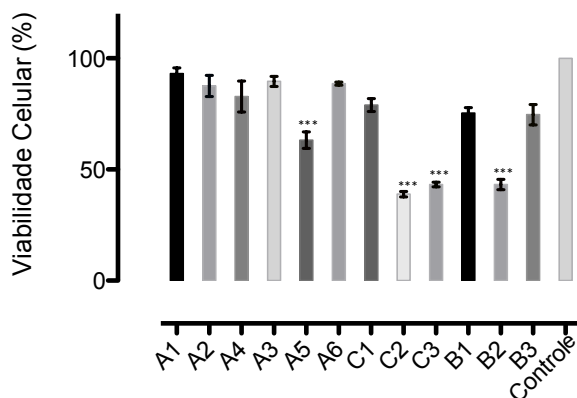
O grupo de pesquisa do Núcleo de Química de Heterociclos (NUQUIMHE) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) vêm desenvolvendo e adaptando rotas sintéticas visando à obtenção de heterociclos estrategicamente substituídos ou análogos estruturais de compostos com possível atividade antitumoral. Neste sentido, foram sintetizadas doze moléculas análogas de pirimidina e disponibilizadas para que o nosso grupo de pesquisa elucidasse os mecanismos de ação das mesmas como antitumoral.

A síntese de compostos baseados na N-alkilação de pirimidinas pode ser uma estratégia promissora no desenvolvimento de moléculas antitumorais. Na busca de novas moléculas com atividade citotóxica para utilização em estudos contra o câncer foi realizado um *screening* com 12 moléculas, análogos de pirimidina, na concentração de 50  $\mu$ M. Esta concentração foi utilizada uma vez que para que uma molécula apresente características satisfatória para atuar como agente antitumoral, é necessário que apresente uma alta citotoxicidade *in vitro* com baixas dosagens. Estes resultados estão mostrados nas Figuras 3, 4 e 5 em diferentes linhagens celulares L1210, B16F10 e CEM respectivamente. Em cada experimento um controle apenas com o DMSO foi realizado, nas mesmas concentrações utilizadas para dissolver os compostos. Esses resultados não foram significativamente diferentes do controle das células sem tratamento (dados não mostrados).

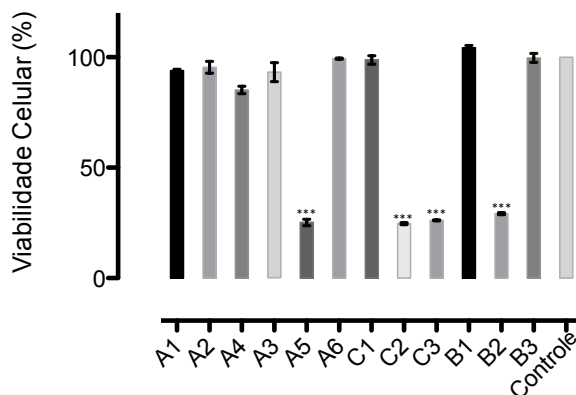
**Figura 3.** Citotoxicidade dos análogos de pirimidina em células L1210. As células ( $1 \times 10^5$ ) foram incubadas por 24 h de 50  $\mu$ M e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT.



**Figura 4.** Citotoxicidade dos análogos de pirimidina em células B16F10. As células ( $1 \times 10^5$ ) foram incubadas por 24 h de 50  $\mu$ M e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT.



**Figura 5.** Citotoxicidade dos análogos de pirimidina em células CEM. As células ( $1 \times 10^5$ ) foram incubadas por 24 h com 50  $\mu$ M de cada composto, separadamente, e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT.

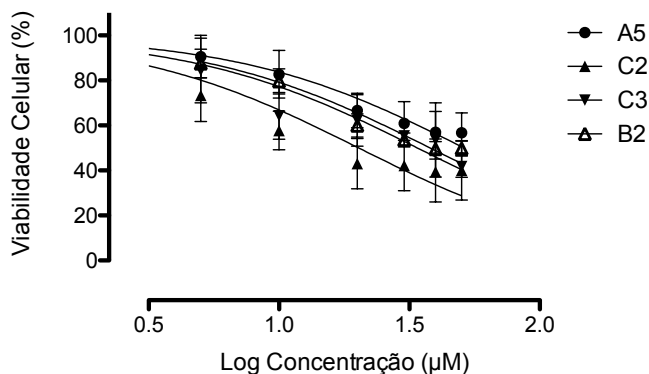


Entre os análogos de pirimidina, os que apresentaram efeito citotóxico relevante foram as moléculas A<sub>5</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> e B<sub>2</sub>, diminuindo a viabilidade celular em cerca de 50 % pelo ensaio de MTT nas três linhagens celulares estudadas. Estes resultados, quando comparados ao controle (células não tratadas), também foram considerados estatisticamente significativos.

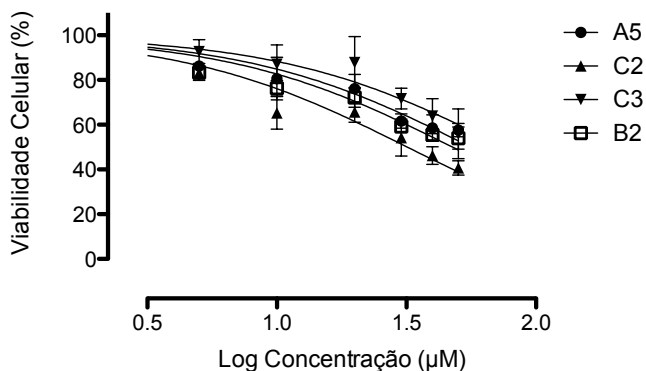
## 5.2. Determinação da Curva de Concentração *versus* Resposta

Motivados pela atividade citotóxica destas quatro moléculas A<sub>5</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> e B<sub>2</sub> nas células avaliadas, estes compostos foram selecionados para continuar os estudos. Assim, foi realizada a avaliação da atividade destas moléculas dependente da concentração em células L1210, B16F10 e CEM podendo-se calcular a CC<sub>50</sub> nas diferentes linhagens celulares estudadas. As Figuras 6, 7 e 8 demonstram a atividade das moléculas dependente da concentração nas células estudadas.

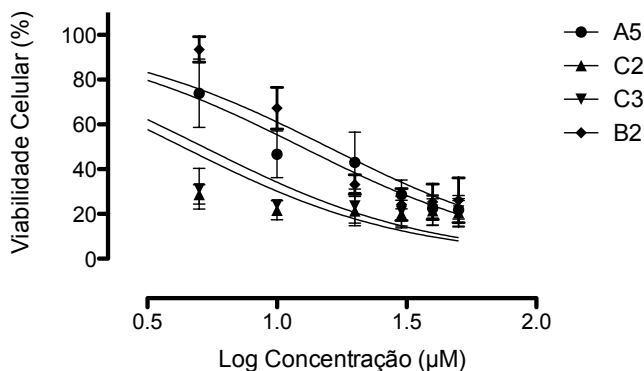
**Figura 6.** Atividade das pirimidinas dependente da concentração em células L1210.  $1 \times 10^5$  células foram incubadas com as pirimidinas (0-50  $\mu\text{M}$ ) por 24 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT e a densidade ótica do grupo controle sem tratamento foi considerada 100% de viabilidade. Cada ponto representa Média  $\pm$  EPM (n=3).



**Figura 7.** Atividade das pirimidinas dependente da concentração em células B16F10.  $1 \times 10^5$  células foram incubadas com as pirimidinas (0-50  $\mu\text{M}$ ) por 24 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT e a densidade ótica do grupo controle sem tratamento foi considerada 100% de viabilidade. Cada ponto representa Média  $\pm$  EPM (n=3).



**Figura 8.** Atividade das pirimidinas dependente da concentração em células CEM.  $1 \times 10^5$  células foram incubadas com as pirimidinas (0-50  $\mu\text{M}$ ) por 24h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT e a densidade ótica do grupo controle sem tratamento foi considerada 100% de viabilidade. Cada ponto representa Média  $\pm$  EPM (n=3).



Após a realização da curva de concentração das moléculas nas diferentes células foi encontrado os valores de  $\text{CC}_{50}$  de cada molécula nas linhagens celulares estudadas que podem ser encontradas na Tabela 4.

**Tabela 4.** Valores de  $\text{CC}_{50}$  das pirimidinas A<sub>5</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> e B<sub>2</sub>, após 24 h de incubação, em células L1210, CEM e B16F10.

| Linhagens celulares | Moléculas      | $\text{CC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) |
|---------------------|----------------|------------------------------------|
| L1210               | A <sub>5</sub> | 51                                 |
|                     | C <sub>2</sub> | 20                                 |
|                     | C <sub>3</sub> | 34                                 |
|                     | B <sub>2</sub> | 48                                 |
| B16F10              | A <sub>5</sub> | 56                                 |
|                     | C <sub>2</sub> | 32                                 |
|                     | C <sub>3</sub> | 75                                 |
|                     | B <sub>2</sub> | 53                                 |
| CEM                 | A <sub>5</sub> | 12                                 |
|                     | C <sub>2</sub> | 4                                  |
|                     | C <sub>3</sub> | 5                                  |
|                     | B <sub>2</sub> | 15                                 |

### 5.3. Análise do tipo de morte celular

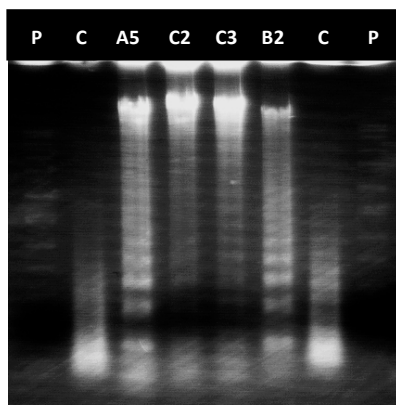
O desenvolvimento de novos compostos para o tratamento de tumores malignos é baseado na capacidade destes compostos de inibirem a proliferação celular e induzirem a apoptose (HERR; DEBATIN, 2001). Da mesma forma, diversos estudos vêm sendo realizados para buscar novos agentes que induzam as células leucêmicas a apoptose (ZHANG et al., 2008; NICHOLSON, 2000; DEBATIN, 2004).

A demonstração de que a apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásica e que vários agentes quimioterápicos agem através da indução deste tipo de morte celular levou a uma intensa investigação dos mecanismos moleculares da apoptose e sua aplicação no tratamento do câncer (NICHOLSON, 2000).

A morte celular programada é definida pela aparência morfológica da célula apoptótica que apresenta fragmentação do DNA genômico em fragmentos oligonucleossomais, condensação da cromatina e perda do volume celular, sem a perda da integridade da membrana (JUN et al., 2007).

A fim de saber se estes compostos causavam apoptose ou necrose, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose. Neste estudo foi verificado que as pirimidinas, previamente selecionadas, fragmentaram o DNA das células L1210 indicando que estes análogos de pirimidina induzem a morte celular por apoptose como mostra a Figura 9.

**Figura 9.** Análise do DNA de células L1210. As células ( $3 \times 10^6$ ) foram incubadas com as pirimidinas A<sub>5</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, B<sub>2</sub> por 24 h, nas respectivas concentrações das IC<sub>50</sub>, sendo representadas na figura pelos respectivos códigos. C representa o controle de células sem tratamento e P o padrão de peso molecular de DNA.





As pirimidinas A<sub>5</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> e B<sub>2</sub> induziram a fragmentação do DNA, característica da morte celular por apoptose, já que é desejável que os fármacos antitumorais sejam capazes de induzir a morte celular por apoptose (JUN et al., 2007).

Dos doze análogos de pirimidina estudados em três linhagens celulares tumorais (L1210, B15F10 e CEM), as que apresentaram efeito citotóxico relevante foram as moléculas A<sub>5</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> e B<sub>2</sub> e estas moléculas induzem a morte celular por apoptose quando avaliadas pelo Método de Fragmentação do DNA. Estes resultados tornam estas moléculas eventualmente promissoras para o tratamento da leucemia linfóide aguda uma vez que os melhores resultados foram para a linhagem de célula leucêmica linfoblástica humana (CEM).

Assim, foi solicitado ao grupo de pesquisa NUQUIMHE (UFSM) sintetizar estas moléculas para continuarmos as pesquisas. Neste primeiro momento a molécula sintetizada em uma quantidade suficiente foi a molécula C<sub>3</sub>.

Desta maneira, procederam-se as investigações mais específicas para esta molécula para identificar o mecanismo de ação em que o tipo de morte celular, envolvimento de caspases, bem como a relação entre a via de morte celular com o estresse oxidativo e estresse do retículo endoplasmático foram avaliados.

De acordo com Winter e colaboradores (2014), foi verificado que o composto estimula a morte celular por apoptose, evidenciado pela fragmentação do DNA, externalização de fosfatidilserina e ativação de caspase-3. O C<sub>3</sub> interfere em várias vias de morte celular. A via mitocondrial foi evidenciada através de uma perturbação do potencial de membrana mitocondrial, liberação do citocromo c e ativação da caspase-9. O C<sub>3</sub> também induziu a ativação das caspases -8 e -12, um aumento no nível de cálcio intracelular, assim como uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS). O aumento da atividade da caspase -8 sugere que a via extrínseca foi ativada e que a produção de ROS e a alteração das atividades da glutatona-S- transferase (GST), glutatona-peroxidase (GPx) e catalase (CAT) e glutatona redutase (GR)) pode estar relacionada com o estresse oxidativo. Finalmente, o aumento da liberação de cálcio e a atividade da caspase -12 pode caracterizar a causa do estresse do retículo endoplasmático (ER). Ainda, o C<sub>3</sub> também foi citotóxico para linhagens celulares humanas de leucemia.

#### **5.4. Estudo de Formulação 1: Influência do emulsificante e do tipo de lipídeo nas características físico-químicas e na biocompatibilidade de nanopartículas lipídicas sólidas**

Com o objetivo de avaliar a influência da concentração de emulsificante e do tipo de lipídeo nas características físico-químicas e na biocompatibilidade de nanopartículas lipídicas sólidas, formulações com diferentes tipos de lipídeos e diferentes concentrações de emulsificantes foram preparadas. Esta abordagem foi escolhida pelo fato de muitos sistemas nanocarreadores de fármacos apresentarem alta citotoxicidade, o que pode inviabilizar a respectiva utilização. Assim, definir a concentração de emulsificante que apresenta menor citotoxicidade e o tipo de lipídeo que poderá ser utilizado para o desenvolvimento da formulação de NLS contendo a molécula C<sub>3</sub>, previamente estudada quanto à atividade *in vitro*, constitui uma informação valiosa na etapa de desenvolvimento de uma formulação viável.

A escolha do lipídeo e dos emulsificantes no desenvolvimento de NLS é uma etapa crítica para o alcance de uma preparação eficiente e possibilidade aplicação dessas nanopartículas, principalmente quando a meta é administração parenteral. Os lipídeos utilizados usualmente para a preparação de NLS incluem triglicerídeos (tripalmitina), glicídeos parciais (monoestearato de glicerila), ácidos graxos (ácido esteárico), esteróis (colesterol) e ceras (cetilpalmitato). Além da matriz lipídica, os emulsificantes com maior frequência de uso são as lecitinas e copolímeros do polioxidoetileno e polioxidopropileno (poloxamer) e polissorbatos, utilizados para evitar a agregação das partículas e estabilizá-las (HUO, ZHOU, 2007; FANG et al., 2008; MÜLLER et al., 2008; KHERADMANDNIA et al., 2010; MARTINS et al., 2012).

##### **5.4.1. Caracterização das NLS**

As NLS foram preparadas com sucesso utilizando o método de ultrassom desenvolvido por Patil (2007). Para compor as formulações foram utilizados os lipídeos tripalmitina, monoestearato de glicerila ou o ácido esteárico, e os emulsificantes lecitina S75 e polissorbato 80 gerando nove formulações (F1 a F9), cujas composições quali-quantitativas estão apresentadas na Tabela 5.

**Tabela 5.** Composição das formulações de NLS.

| NLS | Tripalmitina (%) | Monoestearato de Glicerila (%) | Ácido Esteárico (%) | Polissorbato 80 (%) | Lecitina S75 (%) |
|-----|------------------|--------------------------------|---------------------|---------------------|------------------|
| F1  | 2                | -                              | -                   | 0,4                 | 0,1              |
| F2  | 2                | -                              | -                   | 0,8                 | 0,2              |
| F3  | 2                | -                              | -                   | 1,2                 | 0,3              |
| F4  | -                | 2                              | -                   | 0,4                 | 0,1              |
| F5  | -                | 2                              | -                   | 0,8                 | 0,2              |
| F6  | -                | 2                              | -                   | 1,2                 | 0,3              |
| F7  | -                | -                              | 2                   | 0,4                 | 0,1              |
| F8  | -                | -                              | 2                   | 0,8                 | 0,2              |
| F9  | -                | -                              | 2                   | 1,2                 | 0,3              |

\*% do volume final em tampão PBS

O aspecto macroscópico das suspensões coloidais preparadas pode ser visualizado na Figura 10. As formulações F1 – F6 apresentaram efeito *tyndall* característico de suspensões coloidais. As formulações F7 – F9 apresentaram efeito perolado e com a agitação a intensidade desse efeito é aumentada. Devido a estas características reflexivas, estas formulações não puderam ser analisadas por dispersão de luz dinâmica (DLS).

As formulações de NLS apresentaram valores de índice de polidispersão entre 0,25 a 0,30, enquanto que o tamanho médio variou 116 a 306 nm. É possível sugerir que o tamanho das nanopartículas utilizando tripalmitina como núcleo é inversamente proporcional à concentração de emulsionante, ou seja, quanto maior a concentração de emulsionante menor foi o tamanho da nanopartícula. Já para as formulações F3 a F9, esta relação não é significativa ( $p < 0,05$ ). Outro resultado interessante foi em relação ao potencial zeta, no qual não houve diferença significativa com as alterações na concentração de emulsionante ( $p < 0,05$ ). Todas as formulações apresentaram carga superficial negativa, com valores de -15 a -10 mV (Tabela 6).

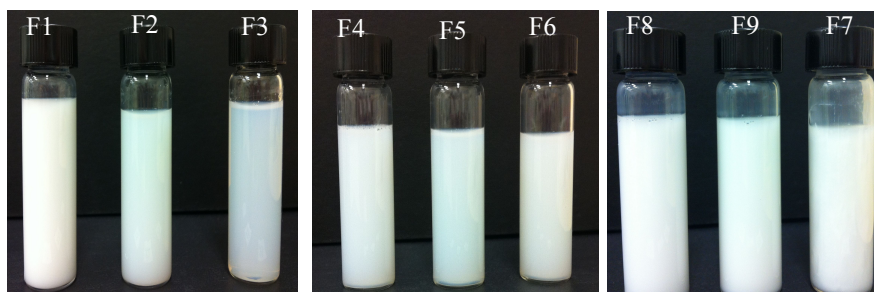
Além de medidas por DLS, a análise por microscopia eletrônica de transmissão foi realizada para obter informações sobre a morfologia das nanopartículas. Como mostrado na Figura 11, as imagens de TEM revelaram que as NLS apresentam morfologia esférica para as formulações F1 a F6. As formulações F5 e F6 apresentaram características porosas. Este achado pode estar relacionado com a concentração de emulsionante utilizada. Porém é necessário maiores investigações.

**Tabela 6.** Características das NLS: tamanho, PI e PZ.

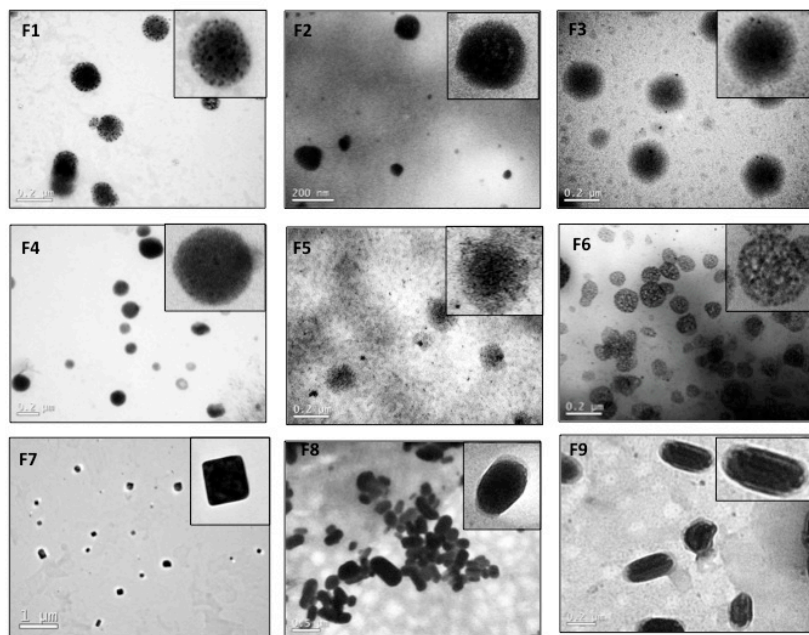
| NLS | Tamanho (nm)* | PI*         | Potencial Zeta (mV)* |
|-----|---------------|-------------|----------------------|
| F1  | 306 ± 9,9     | 0,26 ± 0,06 | -15 ± 0,7            |
| F2  | 167 ± 5,3     | 0,27 ± 0,02 | -14 ± 1,4            |
| F3  | 116 ± 6,9     | 0,25 ± 0,02 | -12 ± 0,7            |
| F4  | 232 ± 13      | 0,26 ± 0,03 | -13 ± 1,8            |
| F5  | 148 ± 9,3     | 0,26 ± 0,02 | -12 ± 1,3            |
| F6  | 135 ± 7,5     | 0,30 ± 0,07 | -11 ± 0,8            |

\*(média ± DP, n = 3)

Curiosamente, as formulações F7 a F9 apresentaram forma quadrada e retangular. Isto explica a não obtenção de medidas fidedignas de tamanho para as formulações F7 a F9 por DLS, uma vez que este método aplica o conceito do diâmetro de esfera equivalente e através de um ajuste matemático calcula o tamanho da partícula. Esta morfologia pode ser explicada por interações soluto-solvente conforme descrito na literatura por GARTI e colaboradores (1982). A modificação cristalina pode ser afetada na preparação de nanopartículas, quando o processo é a quente seguido por resfriamento. A adição de emulsionante pode forçar o ácido esteárico a cristalizar, independentemente das condições de cristalização e a natureza do solvente (GARTI et al., 1982).

**Figura 10.** Característica macroscópica das formulações preparadas.

**Figura 11.** Imagens por microscopia eletrônica de transmissão (MET) das formulações.

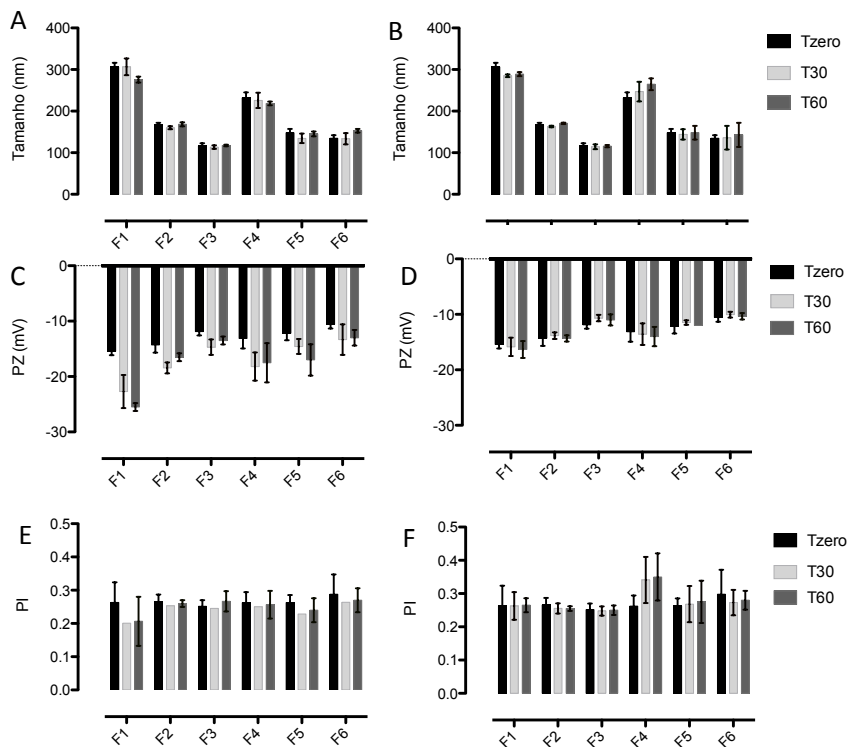


#### **5.4.2. Estudo de Estabilidade**

A informação sobre a estabilidade de NLS em função do tempo de armazenamento é importante para o controle de qualidade na aplicação farmacêutica. Com este intuito, o tamanho, o índice de polidispersão e o potencial zeta das formulações F1 a F6 foram monitorados em função do tempo após armazenamento a 4 e 25 °C (Figura 12). Para todas as formulações avaliadas, nem o tamanho nem a PI apresentaram mudanças significativas até 60 dias em ambas as condições de armazenamento (4 e 25 °C). A boa estabilidade das formulações pode estar relacionada com a proteção conferida pelo emulsificante utilizado. A presença de polissorbato 80 na superfície da partícula proporciona um excelente impedimento estérico, o que impede a agregação das partículas (MULLER, et al, 1995; MULLER, LUCKS, 1996).

## Resultados e Discussão

**Figura 12.** Estabilidade das NLS em função do tempo. (A) Tamanho das NLS F1-F6 até 60 dias a 25 °C. (B) Tamanho das NLS F1-F6 até 60 dias a 4 °C. (C) Potencial Zeta das NLS F1-F6 até 60 dias a 25 °C. (D) Potencial Zeta das NLS F1-F6 até 60 dias a 4 °C. (E) Índice de polidispersão das NLS F1-F6 até 60 dias a 25 °C. (F) Índice de polidispersão das NLS F1-F6 até 60 dias a 4 °C.



Por outro lado, os valores de potencial zeta das formulações F1 e F5 armazenados a 25 °C aumentaram significativamente durante os 60 dias de duração do estudo (Figura 12C). Estes resultados também foram observados por outros grupos (POUTON, PORTER, 2008; HEURTAULT et al., 20013). Esta instabilidade pode ser devido a parâmetros externos como luz e temperatura, o que pode alterar a estrutura cristalina dos lipídeos, além de mudanças no tamanho e potencial zeta, propriedade de grande importância na

manutenção de estabilidade em longo prazo (HEURTAULT et al., 20013) na Figura 12D.

#### **5.4.3. Estudo de Biocompatibilidade celular**

Compreender os efeitos dos diferentes componentes combinados como nanopartículas sobre a viabilidade celular pode fornecer informações úteis para a escolha de uma formulação final. Portanto, foi realizada extensa análise das formulações sobre a viabilidade de fibroblastos e procurou-se outros mecanismos de qualquer eventual citotoxicidade causada pelas formulações NLS.

Tanto os lipídeos quanto os emulsionantes são fisiologicamente bem toleráveis (ANNA, 2007), no entanto, vários trabalhos relatam citotoxicidade deste tipo de nanocarreador. Vale ressaltar que nestes trabalhos a composição das nanopartículas avaliadas variam de natureza, quantidades, além dos métodos de preparação (MULLER et al., 2006; LIU et al., 2008; JOSHI, MÜLLER, 2009; YUAN et al., 2010; PETERSEN et al., 2011). Em outro estudo, foi avaliada a citotoxicidade de NLS em diferentes células (*in vitro*) como fibroblastos, macrófagos e queratinócitos e foi evidenciada que a viabilidade celular foi significativamente afetada pela natureza do lipídeo e a concentração do emulsionante (WEYENBERG et al., 2007).

Um trabalho publicado recentemente por nosso grupo de pesquisa, relatou uma elevada toxicidade de NLS preparada com o emulsionante dodecil sulfato de sódio, o que sugere a dependência das características dos excipientes (lípidos e emulsionantes) sobre citotoxicidade (SILVA et al., 2012b). Além disso, o estado físico da matriz lipídica de NLS também pode perturbar a viabilidade celular além da influência do tamanho e da forma de nanopartículas no efeito biológico final (PETERSEN et al., 2011).

O perfil de citotoxicidade de NLS em fibroblastos foi investigada pelo ensaio MTT em condições *in vitro*. A viabilidade das células NIH/3T3 foi determinado após incubação das células durante 24 h com a CC<sub>50</sub> das NLS, as quais estão apresentados na Tabela 7. Devido ao fato de que os emulsionantes são geralmente considerados potencialmente irritantes ou mal tolerados (POUTON, PORTER, 2008), as concentrações destes ingredientes variaram entre as formulações. Quando a tripalmitina foi utilizada como matriz lipídica (F1-F3), houve uma tendência significativa para a redução de viabilidade com o aumento da concentração do emulsionante. Embora a correlação seja positiva para a redução de tamanho para as formulações F1 a F3, nas NLS F4 a F9 não apresentaram essa tendência relacionada ao tamanho. Isto indica que a combinação de componentes deve ser considerada

como o parâmetro principal para perfis de citotoxicidade do que considerar somente o tamanho.

Estudos (PEREVERZEVA et al., 2007; WEYENBERG et al., 2007; BAE et al., 2009; WANG et al., 2012) indicaram insignificante toxicidade, *in vitro* e *in vivo*, de NLS preparados com lipídios e emulsionantes habitualmente utilizados, tais como utilizados neste estudo. Os resultados contrastantes aqui apresentadas sugerem fortemente que a análise dos componentes devem ser consideradas em conjunto e não separadamente.

Outro dado importante é em relação a morfologia das NLS. As formulações de NLS F7 a F9 apresentam morfologia diferente (quadrado e/ou cúbica) em comparação com as outras nanopartículas (esféricas). Neste sentido, estudos demonstram que variações geométricas de nanopartículas podem influenciar a absorção celular e podem tornar as nanopartículas mais tóxicas, dependendo da geometria apresentada (BROWN et al., 2007; ARNIDA et al., 2011; BRUCKMAN et al., 2014), o que sugere que a forma de nanopartículas pode influenciar no perfil de citotoxicidade.

**Tabela 7.** CC<sub>50</sub> das NLS em linhagem celular de fibroblastos de origem murina NIH/3T3.

| NLS | CC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )* |
|-----|--|
| F 1 | 1420 ± 20                                |
| F 2 | 730 ± 12                                 |
| F 3 | 602 ± 39                                 |
| F 4 | 410 ± 27                                 |
| F 5 | 480 ± 32                                 |
| F 6 | 260 ± 15                                 |
| F 7 | 330 ± 19                                 |
| F 8 | 210 ± 38                                 |
| F 9 | 310 ± 25                                 |

\*CC<sub>50</sub> em µg.mL<sup>-1</sup> de lipídeo total. Os dados são expressos como percentagem de controle (média ± EP, n = 3).

#### 5.4.4. Análise do Ciclo celular

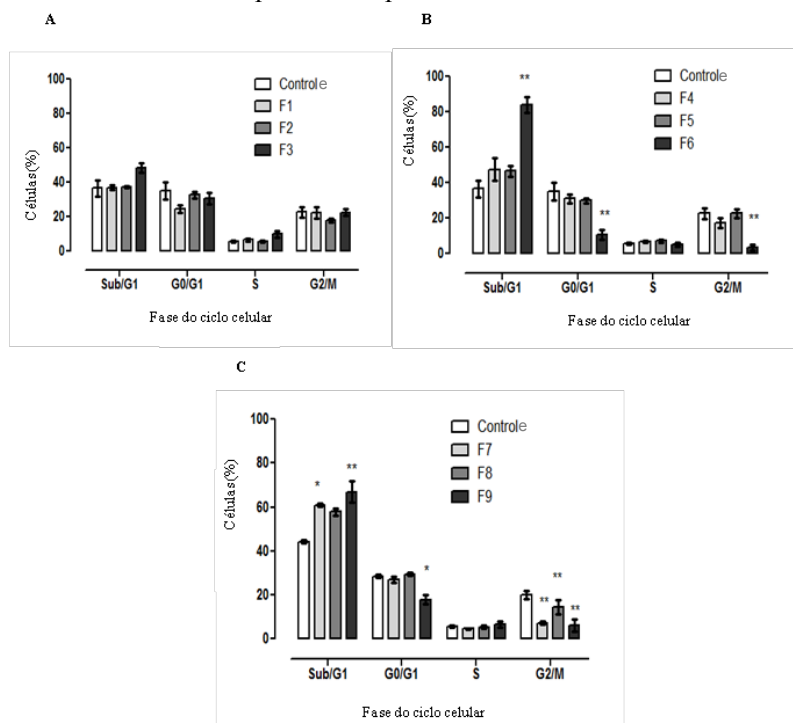
O efeito das NLS no ciclo celular de fibroblastos foi investigado por citometria de fluxo, a fim de determinar se a citotoxicidade pudesse estar associada com alterações no ciclo celular. O iodeto de propídio (PI) é capaz de se ligar no DNA para a avaliação de danos do DNA celular. Com o DNA



## Resultados e Discussão

marcado a identificação de células em hipodiploidia é viável. Como mostrado na Figura 13, 24 h após o tratamento com as formulações F6 a F9, uma redução significativa nas células na fase G2/M foi observada. Consequentemente, houve um aumento no conteúdo de DNA subdiploide relacionado à fase Sub-G1 para as células tratadas com F6, F7 e F9, sendo estatisticamente significativa em comparação com o grupo controle. No geral, os resultados indicam que as formulações que apresentam valor mais baixo que  $CC_{50}$  350  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  causaram uma fragmentação do DNA, como consequência do aumento da fase Sub-G1. Além disso, a fragmentação de DNA é uma das características típicas da morte celular por apoptose, e podem ser considerados em outras investigações.

**Figura 13.** Análise do ciclo celular de fibroblastos após 24 h de exposição com as NLS analisadas por citometria de fluxo. Formulações (A) contendo tripalmitina como matriz lipídica; (B) as formulações contendo monoestearato de glicerila como matriz lipídica; e (C) as formulações contendo o ácido esteárico como matriz lipídica. Os dados são expressos como a média  $\pm$  EP de triplicata independentes.



#### 5.4.5. Identificação do tipo de morte celular

Para caracterizar ainda mais o efeito citotóxico das formulações das NLS, as células foram incubadas com a concentração de  $CC_{50}$  e analisados qualitativamente pelo ensaio de marcação dupla (laranja de acridina e brometo de etídio). O laranja de acridina penetra nas células através da membrana intacta e interage com o DNA tornando-se espectralmente similar à fluoresceína, fazendo com que o núcleo emita uma fluorescência verde; de acordo com a morfologia nuclear são classificadas em células viáveis ou em apoptose. O brometo de etídio é capaz de penetrar apenas em células com a membrana alterada e ao interagir com o DNA deixa o núcleo com uma coloração alaranjada fluorescente, caracterizando células necróticas ou com necrose secundária. As células em apoptose inicialmente apresentam o núcleo picnótico com as cromatinas condensadas e numa etapa mais avançada pode se observar a fragmentação nuclear formando corpos apoptóticos.

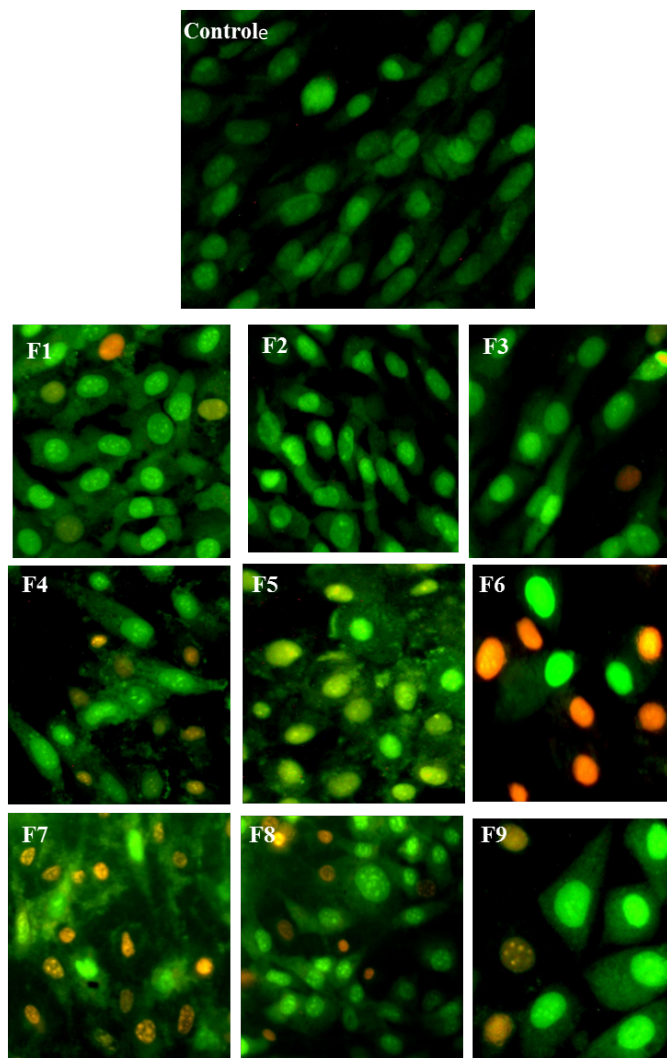
A Figura 14 mostra imagens representativas de fibroblastos tratados com cada formulação. Foi possível observar a morfologia da fragmentação de DNA em algumas células, e está bem correlacionada com os resultados da análise do ciclo celular (Figura 15). Como mostrado na Figura 15, não houve diferença estatística para as formulações de F1 a F5 em comparação com o controle (células não tratadas), apresentando um padrão semelhante com um elevado número de células viáveis. Por outro lado, a formulação F6 apresentou um aumento do número de células necróticas. A incubação de células com as formulações F7 e F8 resultou na redução da viabilidade celular para um valor semelhante de aumento das células em apoptose e necrose. Embora, tenha ocorrido também uma diminuição de células viáveis tratadas com F9, esta redução não foi tão grande como em células tratadas com F7 e F8.

Curiosamente, apesar de ter usado o valor  $CC_{50}$  como a concentração de testes, não foi possível observar 50% de células marcadas em laranja, sugerindo que a morte celular também foi causado por um mecanismo diferente que não seja a desestabilização da membrana (padrão necrose). As diferenças observadas entre os resultados obtidos por estes dois ensaios pode ser devido as diferenças relacionadas com os aspectos da morte celular que foi possível avaliar em cada ensaio.

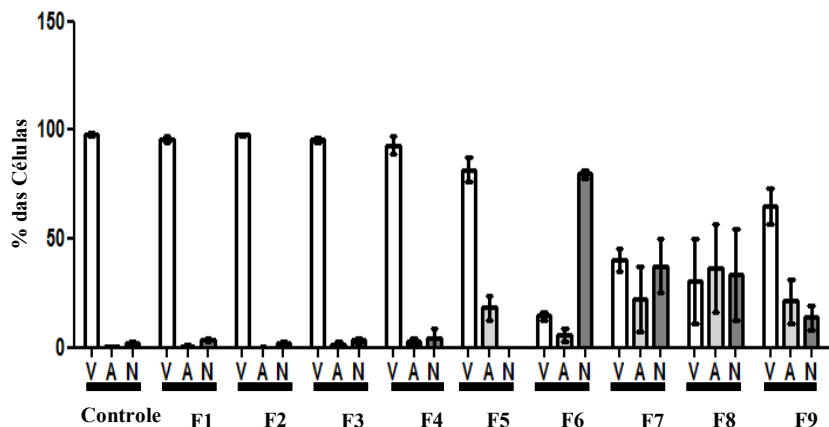
Enquanto o ensaio de MTT permite observar a atividade mitocondrial, o ensaio de laranja de acridina e brometo de etídio permite avaliar a integridade da membrana da célula, ou seja, as mitocôndrias ainda podem funcionar mesmo se a membrana plasmática apresenta algum dano. Além disso, devido ao carácter *in vitro* do ensaio, em que os corpos apoptóticos não podem ser

removidos por macrófagos como seriam *in vivo*, as células apoptóticas podem finalmente ser submetidas ao processo de necrose e resultar em um aumento no número de células necróticas.

**Figura 14.** Microscopia de células coradas com laranja de acridina ( $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e brometo de etídio ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) após 24 horas de exposição com as NLS F1-F9. Imagens dos campos foram adquiridas com uma ampliação de 200 X.



**Figura 15.** Quantificação de células viáveis e mortas de acordo com a identificação morfológica obtido por coloração dupla com laranja de acridina (0,3 mg.mL<sup>-1</sup>) e brometo de etídio (1 mg.mL<sup>-1</sup>) depois de 24 horas de exposição com as NLS F1-F9. (V) Células viáveis; (A) Células em apoptose; (N) Células necróticas. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EP de seis campos.



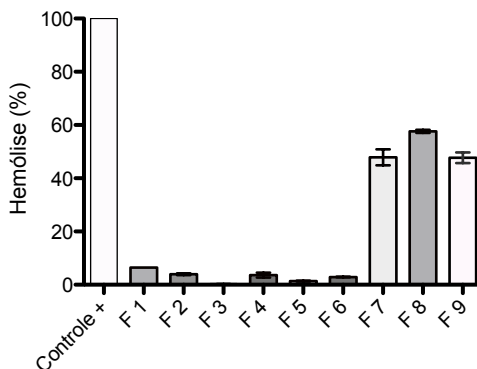
#### 5.4.6. Determinação da Hemólise

Nanopartículas lipídicas estão cada vez mais estudadas como carreadores coloidais de fármacos para aplicação intravenosa (WANG et al., 2009). A atividade hemolítica foi utilizada com screening de toxicidade *in vitro*, e também serve como uma medida simples e de confiança para a estimativa do dano da membrana causada por uma formulação aplicada por via intravenosa (JOSHI et al., 2008).

Como mostrado na Figura 16, mesmo após uma hora de exposição das células com as NLS, F1-F6 não houve indução de hemólise, indicando que não há perturbação detectável das membranas dos eritrócitos. Ao contrário, as NLS F7 a F9 mostraram alta taxa hemolítica indicando toxicidade para células sanguíneas. As formulações F7 a F9 resultaram em 47,8, 57,6 e 47,7% de hemólise de eritrócitos, respectivamente. Em geral, um baixo potencial hemolítico de NLS F1-F6 foi confirmado, o que sugere que o tipo de lipídeo e/ou forma da nanopartícula pode reduzir a interação de componentes do sangue. Além disso, vale a pena notar que as amostras

testadas foram expostas a eritrócitos, durante uma hora e é improvável que isto aconteça, *in vivo*.

**Figura 16.** Atividade hemolítica das NLS (F1 a F9) em eritrócitos humanos. As células sanguíneas foram expostas com as NLS por uma hora. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EP, n=3.



### 5.5. Estudo de Formulação 2: Aplicação de delineamento experimental para otimizar uma formulação

Após realizar um estudo de formulação selecionando os lipídeos com menor citotoxicidade celular e verificando a melhor faixa de concentração dos emulsionantes, o passo seguinte foi realizar um delineamento experimental contendo fatores categóricos e numéricos essenciais para desenvolver um sistema de nanopartículas lipídicas sólidas visando à administração parenteral.

Para a produção de NLS muitos métodos podem ser utilizados e, durante o processo de fabricação, vários parâmetros parecem ter influência marcante sobre as propriedades físico-químicas das nanopartículas (WERKEMA, 1996).

Uma das maneiras de otimizar o desenvolvimento de uma forma farmacêutica é o planejamento através de um delineamento experimental. Planejamentos deste tipo são de grande utilidade em investigações preliminares, quando se deseja saber se determinados fatores têm ou não influência sobre a resposta. São planejamentos simples de serem executados e podem ser ampliados para formar um planejamento mais complexo, que é

necessário quando se quer conhecer melhor a relação entre a resposta e os fatores (BUTTON, 2001).

A principal vantagem da utilização de um delineamento experimental é a redução do número de experimentos e a capacidade de extrair o máximo de informações dos resultados obtidos, e ainda, a possibilidade de otimizar uma formulação com elevado grau de precisão (WERKEMA, 1996; BARROS NETO, BRUNS, 2002; GABRIELSSON, LINDBERG, LUNDSTEDT, 2002).

A escolha das variáveis, bem como sua magnitude, baseia-se em conhecimentos prévios. Todas as variáveis são alteradas simultaneamente para cobrir a área total de interesse com o menor número possível de experimentos. Outra razão importante para se utilizar um planejamento experimental é a possibilidade de se avaliar a relação entre os fatores nos resultados obtidos (GABRIELSSON, LINDBERG, LUNDSTEDT, 2002).

A Metodologia de superfície de Respostas (MSR) é uma ferramenta eficiente para otimizar as propriedades de formulações farmacêuticas. Esta metodologia é baseada na variação simultânea de vários fatores, chamados de variáveis independentes, previamente selecionados pela influência nas propriedades do processo, e de variáveis dependentes, também chamados de respostas do processo. Com a utilização de técnicas matemáticas e estatísticas, os resultados experimentais indicam uma combinação de níveis dos fatores dentro de uma região ótima (BARROS NETO, BRUNS, 2002; GABRIELSSON, LINDBERG, LUNDSTEDT, 2002; BOX, HUNTER, 2007).

O sucesso de um delineamento experimental se fundamenta na capacidade de fornecer exatamente o tipo de informação que o analista deseja. Assim, a atividade mais importante não está na análise dos dados, e sim no planejamento dos experimentos em que estes dados devem ser obtidos (BARROS NETO, BRUNS, 2002).

De acordo com FERREIRA e colaboradores (2014), do ponto de vista estatístico, dados os objetivos do experimento e o conhecimento de alguma informação prévia sobre o problema, é possível escolher os valores das variáveis experimentais de maneira ótima, mesmo no caso do uso de modelos não lineares, como foi neste estudo. A utilização de valores ótimos para as variáveis experimentais significa que resultados mais precisos serão obtidos nas estimativas do tempo e custo será menor quando comparado com a alternativa que não é ótima. Além do mais, quanto maior o experimento, mais difícil é o controle das condições experimentais. A falta de controle introduz heterogeneidade no sistema, acarretando em resultados imprecisos além de desperdício de recursos e tempo.

Para o desenho experimental, as variáveis estudadas para verificar a influência sobre os parâmetros físico-químicos das NLS foram o tipo de lipídeo e suas concentrações, a quantidade de solvente e a proporção entre os emulsionantes (iônico e não-iônico). Estas variáveis, bem como seus domínios experimentais, estão descritas na Tabela 2 (página 68).

O delineamento experimental foi aplicado com o objetivo de maximizar a eficácia experimental através de um número reduzido de experimentos e estudar a influência de cada fator na produção de NLS. Através de modelos de regressão polinomial, equações matemáticas foram traçadas para descrever o comportamento de cada resposta analisada (variáveis dependentes) em relação aos fatores trabalhados (variáveis independentes). As equações matemáticas traçadas levaram em consideração as significâncias estatísticas dos fatores, incluindo somente aqueles que apresentam relevância estatística. O intercepto de cada equação foi determinado como a média geométrica das respostas observadas para cada variável dependente. Os coeficientes de cada termo foram calculados em relação aos termos codificados, permitindo a comparação de sua relativa magnitude à de outros termos, facilitando a análise do efeito de cada termo na resposta analisada.

Cada variável independente (fatores categóricos ou numéricos), descritos na Tabela 2 (página 68), foram combinadas para gerar as formulações representativas dos fatores pré-estabelecidos de cada formulação como mostra a Tabela 8. Neste estudo, trinta formulações foram geradas randomicamente e nomeadas de F1 a F30.

As variáveis dependentes (respostas) tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta para as formulações de NLS desenvolvidas estão descritas na Tabela 8. O tamanho variou entre 107 nm (F5) e 240 nm (F30), enquanto o índice de polidispersão variou entre 0,23 (F9) e 0,28 (F4, F7, F24, F27). O potencial zeta ( $\zeta$ ) variou entre -14 mV e -19 mV (F26).

Na Tabela 9 estão resumidos os resultados da análise de variância para o delineamento experimental realizado.

**Tabela 8.** Composição das NLS e resultados obtidos dos parâmetros analisados.

| Formula-<br>ção | Variáveis independentes |                |                       |                   | Variáveis dependentes |      |              |
|-----------------|-------------------------|----------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|------|--------------|
|                 | Emulsionante<br>(%)     | Lípido<br>(mg) | Sol-<br>vente<br>(mL) | Tipo de<br>Lípido | Tama-<br>nho<br>(nm)  | PDI  | $\zeta$ (mV) |
| 1               | 1,00                    | 300            | 0,4                   | TRP               | 215                   | 0,24 | -16          |
| 2               | 1,00                    | 300            | 0,4                   | TRP               | 220                   | 0,24 | -16          |
| 3               | 1,00                    | 200            | 0,4                   | TRP               | 147                   | 0,26 | -16          |
| 4               | 1,50                    | 300            | 0,4                   | MEG               | 154                   | 0,28 | -14          |
| 5               | 1,25                    | 200            | 0,2                   | TRP               | 107                   | 0,24 | -16          |
| 6               | 1,00                    | 250            | 0,3                   | TRP               | 164                   | 0,27 | -18          |
| 7               | 1,00                    | 300            | 0,3                   | MEG               | 204                   | 0,28 | -15          |
| 8               | 1,50                    | 200            | 0,3                   | TRP               | 108                   | 0,24 | -16          |
| 9               | 1,25                    | 250            | 0,3                   | TRP               | 122                   | 0,23 | -16          |
| 10              | 1,25                    | 200            | 0,4                   | MEG               | 140                   | 0,25 | -14          |
| 11              | 1,25                    | 300            | 0,3                   | TRP               | 147                   | 0,24 | -14          |
| 12              | 1,50                    | 250            | 0,2                   | MEG               | 130                   | 0,21 | -14          |
| 13              | 1,50                    | 300            | 0,2                   | TRP               | 144                   | 0,24 | -15          |
| 14              | 1,00                    | 200            | 0,2                   | MEG               | 137                   | 0,27 | -14          |
| 15              | 1,25                    | 250            | 0,3                   | MEG               | 125                   | 0,24 | -14          |
| 16              | 1,00                    | 300            | 0,2                   | TRP               | 220                   | 0,27 | -18          |
| 17              | 1,00                    | 200            | 0,2                   | MEG               | 151                   | 0,27 | -14          |
| 18              | 1,00                    | 250            | 0,4                   | MEG               | 175                   | 0,26 | -17          |
| 19              | 1,00                    | 200            | 0,4                   | TRP               | 150                   | 0,27 | -16          |
| 20              | 1,50                    | 300            | 0,2                   | TRP               | 143                   | 0,25 | -15          |
| 21              | 1,00                    | 300            | 0,2                   | TRP               | 234                   | 0,27 | -18          |
| 22              | 1,50                    | 300            | 0,4                   | MEG               | 150                   | 0,27 | -14          |
| 23              | 1,50                    | 200            | 0,3                   | MEG               | 120                   | 0,25 | -14          |
| 24              | 1,50                    | 300            | 0,4                   | MEG               | 144                   | 0,28 | -14          |
| 25              | 1,25                    | 200            | 0,2                   | TRP               | 100                   | 0,24 | -16          |
| 26              | 1,00                    | 250            | 0,3                   | TRP               | 172                   | 0,27 | -19          |
| 27              | 1,00                    | 300            | 0,3                   | MEG               | 210                   | 0,28 | -16          |



## Resultados e Discussão

|    |      |     |     |     |     |      |     |
|----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|
| 28 | 1,00 | 200 | 0,4 | TRP | 156 | 0,26 | -17 |
| 29 | 1,00 | 300 | 0,2 | TRP | 234 | 0,27 | -17 |
| 30 | 1,00 | 300 | 0,2 | TRP | 240 | 0,27 | -17 |

**Tabela 9.** Resultado da análise de variância para as respostas obtidas.

| Termo polinomial         | Tamanho de Partícula |          | Polidispersão (PI)     |          | Potencial Zeta (g) |          |
|--------------------------|----------------------|----------|------------------------|----------|--------------------|----------|
|                          | Coefficiente         | p        | Coefficiente           | p        | Coefficiente       | p        |
| Modelo                   | -                    | < 0,0001 | -                      | < 0,0001 | -                  | < 0,0001 |
| Intercepto               | 124,44               | -        | 0,23                   | -        | 15,07              | -        |
| A                        | -22,80               | < 0,0001 | -0,015                 | < 0,0001 | 0,82               | < 0,0001 |
| B                        | 22,81                | < 0,0001 | 5,354*10 <sup>-4</sup> | 0,5991   | 0,38               | 0,0028   |
| C                        | 4,79                 | 0,0048   | 2,388*10 <sup>-3</sup> | 0,0733   | -0,16              | 0,1347   |
| D                        | -                    | -        | 4,477*10 <sup>-3</sup> | 0,0007   | 0,88               | < 0,0001 |
| AB                       | -15,75               | < 0,0001 | 0,011                  | < 0,0001 | 0,34               | 0,0066   |
| AC                       | 6,63                 | 0,0006   | 5,159*10 <sup>-3</sup> | 0,0037   | -                  | -        |
| AD                       | -                    | -        | 3,042*10 <sup>-3</sup> | 0,0277   | -                  | -        |
| BC                       | -7,50                | < 0,0001 | -                      | -        | -                  | -        |
| BD                       | -                    | -        | -                      | -        | -                  | -        |
| CD                       | -                    | -        | 0,013                  | < 0,0001 | -0,86              | < 0,0001 |
| A <sup>2</sup>           | 20,17                | < 0,0001 | 0,022                  | < 0,0001 | -1,48              | < 0,0001 |
| B <sup>2</sup>           | -                    | -        | 0,016                  | < 0,0001 | 1,34               | < 0,0001 |
| C <sup>2</sup>           | 17,63                | < 0,0001 | -0,019                 | < 0,0001 | -                  | -        |
| R <sup>2</sup>           | 0,9833               |          | 0,9696                 |          | 0,9355             |          |
| R <sup>2</sup> ajustado  | 0,9770               |          | 0,9511                 |          | 0,9109             |          |
| R <sup>2</sup> preditivo | 0,9631               |          | 0,8920                 |          | 0,8786             |          |

\*A - Emulsificante (%); B - Lipídeo (mg); C - Solvente (mL); D - Tipo de Lipídeo; AB, AC, AD, BC, BD, CD representam interações; A<sup>2</sup>, B<sup>2</sup> e C<sup>2</sup> representam termos quadráticos.

O tamanho de partícula apresentou um modelo quadrático modificado significativo ( $p < 0,0001$ ), com coeficientes de correlação ( $R^2$ ) ajustado e preditivo bastante próximos a 1,0. Verificou-se também que estes

valores apresentaram uma diferença inferior a 0,2, indicando coerência entre os valores experimentais e os valores preditos através da equação polinomial que rege este modelo (Equação 5):

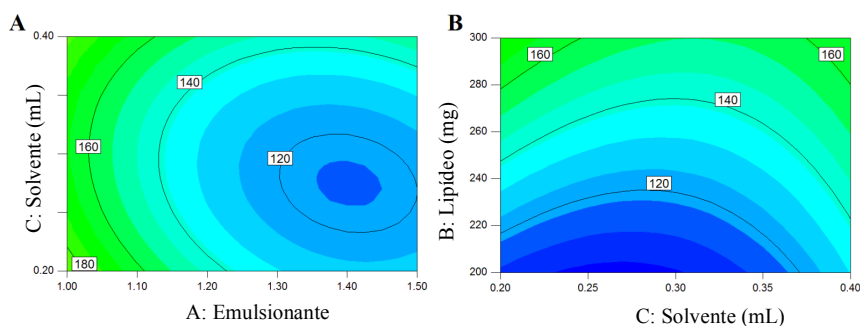
$$\text{Tamanho} = 124,44 - 22,80 * A + 22,81 * B + 4,79 * C - 15,75 * AB + 6,63 * AC - 7,50 * BC + 20,17 * A^2 + 17,63 * C^2 \quad (5)$$

Em geral, é possível notar que os efeitos da concentração de emulsionante (A,  $p < 0,0001$ ) geram uma tendência à redução do tamanho de partícula (coeficiente negativo). Por sua vez, o acréscimo na quantidade de lipídeo (B,  $p < 0,0001$ ) leva ao aumento do tamanho de partícula em decorrência da maior quantidade de lipídeo disponível para formação das nanopartículas. Entretanto, a interação entre estes dois fatores também se apresenta estatisticamente relevante (AB,  $p < 0,0001$ ). Em decorrência do coeficiente negativo da interação, é possível inferir que o aumento na quantidade de emulsionante utilizada, associado ao aumento na quantidade de lipídeo, potencializa a capacidade do emulsionante em reduzir o tamanho de partícula. Da mesma forma, a interação AB reduz a capacidade do aumento da concentração de lipídeo em aumentar o tamanho de partícula do sistema. Verificou-se que, na maior quantidade de lipídeo (300 mg), o aumento da concentração do emulsionante promoveu maior capacidade em reduzir o tamanho de partícula. Quando baixas quantidades de lipídeo foram utilizadas (200 mg), embora o tamanho de partícula obtido nas formulações seja usualmente inferior àquelas contendo 300 mg de lipídeo, a capacidade do emulsionante em reduzir mais ainda o tamanho de partícula foi limitada. Tal comportamento ocorreu independente do tipo de lipídeo utilizado ou da quantidade de solvente.

Verificou-se também que o volume de solvente utilizado tem papel importante no tamanho de partícula obtido na preparação das NLS. Em geral, o aumento no volume de solvente leva ao aumento no tamanho de partícula. Verificou-se que a interação entre quantidade de emulsionante e de solvente (AC,  $p = 0,0006$ ) foi estatisticamente relevante. Esta interação, por apresentar coeficiente positivo, indica que a capacidade do emulsionante em reduzir o tamanho de partícula do sistema é reduzida à medida que se aumenta o volume de solvente utilizado, requerendo desta forma o emprego de maiores concentrações de emulsionante para manter o tamanho de partícula estável à medida que se aumenta a quantidade de solvente (Figura 17A). A interação entre a quantidade de lipídeo e de solvente também foi estatisticamente relevante (BC,  $p < 0,0001$ ), cujo coeficiente negativo indica que o aumento da quantidade de solvente associado ao aumento da quantidade de lipídeo

reduz a capacidade isolada de cada fator em aumentar o tamanho de partícula, embora ainda leve ao aumento do tamanho de partícula (Figura 17B). Embora tanto o aumento do tamanho de partícula seja uma consequência do aumento da quantidade de lipídeo e de solvente, uma formulação preparada, por exemplo, com 300 mg de lipídeo e 0,2 mL de solvente tenderá a um tamanho de partícula maior quando comparado a uma preparada com a mesma quantidade de lipídeo e 0,3 mL de solvente. É importante destacar aqui que, em decorrência do termo quadrático significativo para a quantidade de solvente ( $C^2$ ,  $p < 0,0001$ ), tal afirmação é verdadeira somente para quantidades de solvente inferiores a 0,3 mL, já que em concentrações muito elevadas, a capacidade do solvente em aumentar o tamanho de partícula sobressai o efeito da interação (Figura 17B). Qualquer resposta relacionada ao tipo de lipídeo não apresentou relevância estatística, indicando que a escolha entre TRP e MEG não afeta o tamanho de partícula médio obtido das NLS.

**Figura 17.** Gráficos de contorno avaliando o efeito da (A) concentração do emulsionante *versus* a quantidade de solvente (MEG; 250 mg de lipídeo) e (B) quantidade de solvente *versus* quantidade de lipídeo (MEG; 1,25 % de emulsionante) sobre o tamanho de partícula das NLS (nm).



Ao analisar o parâmetro polidispersão (Tabela 9), foi possível estabelecer um modelo quadrático modificado ( $p < 0,0001$ ) representativo desta resposta em relação ao domínio experimental analisado. Os valores de  $R^2$  ajustado e preditivo obtidos garantem a qualidade do modelo matemático e indicam coerência entre os valores experimentais e calculados. A equação polinomial codificada que rege este modelo está representada na Equação 6:

(6)

$$PI = 0,23 - 0,015 * A - 5,354 * 10^{-4} * B + 2,388 * 10^{-3} * C + 4,477 * 10^{-3} * D + 0,011 * AB + 5,159 * 10^{-3} * AC + 3,042 * 10^{-3} * AD + 0,013 * CD + 0,022 * A^2 + 0,016 * B^2 - 0,019 * C^2$$

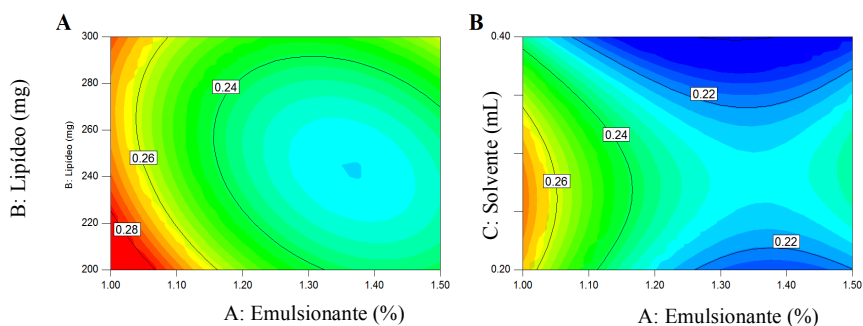
É importante destacar que, no caso da PI, valores adequados foram obtidos para todas as formulações, variando na faixa de 0,21 a 0,28. Para esta resposta, verifica-se que a quantidade de emulsionante empregada ( $A$ ,  $p < 0,0001$ ), bem como a interação desta com a quantidade de lipídeo ( $AB$ ,  $p < 0,0001$ ), acarreta em significativa modificação da polidispersão das formulações. Em geral, verifica-se uma redução na polidispersão à medida que se aumenta a concentração de emulsionante e mantem-se concentrações intermediárias de lipídeo (Figura 18A). Independente das condições empregadas, concentrações baixas de emulsionante geraram maior polidispersão quando comparadas às concentrações superiores. Em todos os casos, o uso de MEG levou a uma polidispersão levemente maior quando comparado ao TRP, indicando que este promove a formação de nanopartículas com melhor homogeneidade de tamanho.

Da mesma forma, observa-se que a interação entre a quantidade de solvente empregada e a concentração de emulsionante ( $AC$ ,  $p = 0,0037$ ) também influencia aumentando a PI das formulações (coeficiente positivo). É importante observar que o aumento da concentração de emulsionante leva à redução na PI. Neste caso, ao empregar quantidades mínimas ou máximas de solvente, reduz-se a PI. Quantidades intermediárias de solvente apresentaram tendência à produção de formulações levemente mais polidispersas (Figura 18B). Em decorrência desta interação, verificou-se que a concentração do emulsionante é especialmente importante quando se trabalha com solvente no limite inferior (0,2 mL). Nestas condições, o aumento na concentração do emulsionante promove melhor controle da PI. Da mesma forma, empregando volumes maiores de solvente, a necessidade de incremento na concentração do emulsionante reduz consideravelmente, pois as formulações nestas condições apresentam melhores índices de PI.

As NLS são suspensões coloidais que devem ser estabilizadas com um sistema emulsionante capaz de evitar a agregação das partículas. Os emulsionantes podem atuar por dois tipos de mecanismo de ação. O primeiro baseia-se na repulsão eletrostática, quando utilizado um emulsionante com carga iônica (aniônico ou catiônico). Desta forma, para garantir a estabilidade da nanopartícula é necessário que o potencial zeta seja superior ao módulo de

30 mV. O segundo mecanismo é chamado de impedimento estérico, no qual o emulsificante não apresenta carga eletrostática e a estabilização do sistema se dá pelo impedimento estérico dos emulsionantes não-iônicos, não sendo necessário obter um alto valor no potencial zeta para que ocorra estabilização das nanopartículas.

**Figura 18.** Gráficos de contorno avaliando o efeito da (A) concentração do emulsificante *versus* a quantidade de lipídeo (TRP; 0,3 mL de solvente) e (B) quantidade de emulsificante *versus* quantidade de solvente (TRP; 250 mg de lipídeo) sobre o índice de polidispersão (PI) das NLS (adimensional).



Geralmente, misturas binárias de emulsionantes são muito mais efetivas para estabilizar o sistema do que um só emulsificante. Assim, uma mistura de emulsionantes iônico e não-iônico é interessante, uma vez que a estabilização do sistema se dará por uma combinação de mecanismos, a repulsão eletrostática, no caso do emulsificante iônico, e a estabilização estérica no caso do emulsificante não-iônico. Assim, os emulsionantes selecionados foram o polissorbato 80 (não-iônico) e a lecitina S75 (anfótero). Neste estudo, avaliaram-se três concentrações de emulsificante (1,0; 1,25 e 1,50 %). Para todas as concentrações emulsionantes avaliadas, a relação adequada entre o emulsificante hidrofílico e lipofílico foi determinada previamente como 1:4 (lecitina:polissorbato). Sendo assim, para concentrações de emulsificante de 1,0, 1,25 e 1,50 %, as concentrações de lecitina e polissorbato foram de 0,2 e 0,8 %, 0,25 e 1,0 % e 0,3 e 1,2 %, respectivamente.

O potencial zeta reflete a carga de superfície de partículas, o qual é fortemente influenciado pelos componentes de uma formulação. Assim, por si só, espera-se que o emulsificante e a quantidade e tipo de lipídeo tenham influência significativa nesta variável. Tal fato foi confirmado através da

ANOVA, onde se verificou que todos os três fatores foram relevantes desde seus termos pai (A,  $p = < 0,0001$ ; B,  $p = 0,0028$ ; D,  $p < 0,0001$ ). Os valores de  $R^2$  ajustado e preditivo validaram o modelo para predição por indicar coerência entre os valores experimentais e os calculados. Dentro do domínio experimental estudado, foi possível determinar a equação polinomial codificada para o modelo quadrático modificado que rege esta resposta (Equação 7):

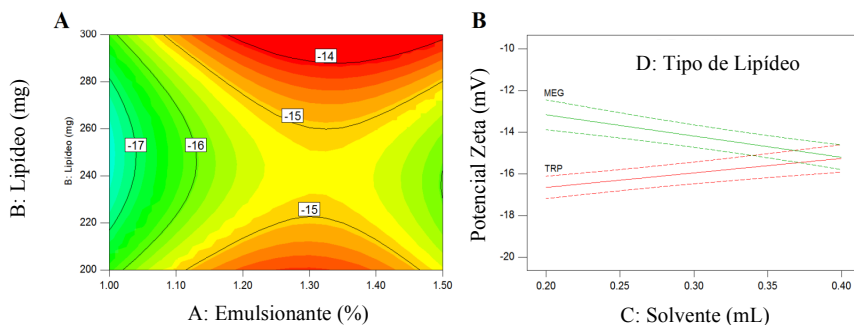
$$PZ = -15,07 + 0,82 * A + 0,38 * B - 0,16 * C + 0,88 * D + 0,34 * AB - 0,86 * CD - 1,48 * A^2 + 1,34 * B^2 \quad (7)$$

Verifica-se pelo intercepto negativo do modelo e pela baixa magnitude de todos os coeficientes dos termos em comparação ao intercepto que o  $\zeta$  para as formulações preparadas sempre se manterá negativo. A carga de superfície negativa é justificada pelo uso da lecitina S75 como componente tensoativo, cuja característica aniônica prevalece na superfície das partículas. A baixa magnitude desta resposta sugere que o mecanismo de estabilização das formulações ocorre primariamente por impedimento estérico.

A interação entre a quantidade de emulsionante e lipídeo foi estatisticamente relevante (AB,  $p = 0,0066$ ). Conforme demonstrado na Figura 19A, o aumento na concentração do emulsionante leva ao aumento do  $\zeta$  e, por sua vez, o acréscimo na quantidade de lipídeo acarreta na redução da resposta. Entretanto, vale destacar que as diferenças observadas, na faixa de -14 a -19 mV, embora estatisticamente relevantes, não são diferenças que impactam significativamente no desenvolvimento de uma formulação.

Conforme esperado inicialmente, a quantidade de solvente utilizada na formulação por si só não influenciou diretamente o  $\zeta$ , entretanto verificou-se que este fator esteve envolvido em uma interação estatisticamente relevante quando associado ao tipo de lipídeo (CD,  $p < 0,0001$ ). Conforme evidenciado na Figura 19B, o uso de TRP associado às baixas quantidades de solvente acarreta em menor  $\zeta$  quando comparado às formulações preparadas em condições semelhantes, porém empregando MEG. Quando se utiliza quantidades maiores de solvente (0,4 mL), observa-se que a diferença entre  $\zeta$  causado pelo tipo de lipídeo empregado não ocorre mais. Tal interação é extremamente importante, pois demonstra que um fator como quantidade de solvente, o qual não deveria inicialmente influenciar a mobilidade eletroforética das partículas, pode gerar diferenças dependendo do tipo de lipídeo empregado. Vale ressaltar que, neste caso, a quantidade de lipídeo e de emulsionante não alteram o comportamento da interação.

**Figura 19.** (A) Gráfico de contorno avaliando o efeito da concentração do emulsionante *versus* a quantidade de lipídeo (TRP; 0,4 mL de solvente) e (B) Gráfico de interação entre quantidade de solvente *versus* tipo de lipídeo (1,25 % de emulsionante; 250 mg de lipídeo), ambos sobre o potencial zeta ( $\zeta$ ) das NLS (mV).



A utilização de um delineamento experimental é considerada uma estratégia analítica útil e suas principais aplicações residem tanto na triagem das variáveis mais relevantes de um determinado sistema analítico, assim como na otimização e melhoramento destas (MYERS, MONTGOMERY, ANDERSON-COOK, 2009). Para tais finalidades, existem diferentes tipos de delineamentos experimentais, onde os algoritmos mais simples buscam a triagem das variáveis mais significativas, e os mais avançados permitem refinamento e um melhor conhecimento do sistema em estudo (BARROS NETO, BRUNS, 2002).

Desta forma, a escolha do tipo de delineamento experimental a ser empregado é de suma importância para garantir o sucesso no aperfeiçoamento do produto/processo em questão. Neste estudo, partiu-se de informações obtidas por experimentos preliminares, e aplicou-se assim um delineamento do tipo Superfície de Resposta visando à avaliação extensa das variáveis de formulação que mais afetam as características físico-químicas de nanopartículas lipídicas sólidas.

A escolha do delineamento foi feita buscando a opção que mais se adequasse ao objetivo: obtenção de equações polinomiais representativas para o efeito das variáveis estudadas no tamanho de partícula, polidispersão e potencial zeta das NLS. Dentre os delineamentos de superfície de resposta, optou-se pelo uso do algoritmo *D-Optimal*, o qual busca estimar mais acuradamente os coeficientes de cada termo do modelo, fornecendo resultados mais robustos quando se busca identificar e mensurar os fatores

que influenciam nas diferentes respostas estudadas (JONES, GOOS, 2012; SAMBO, BORROTI, MYLONA, 2014).

Assim, a partir da função de desejabilidade, que permite a inserção do peso e da importância de cada resposta previamente estabelecida pode-se otimizar uma formulação com o intuito de obter características desejáveis para a incorporação de fármacos ou outros insumos ativos. Estes dados podem ser visualizados na Tabela 10 que mostra os fatores numéricos e categóricos pré-estabelecidos com seus limites (inferior e superior) bem como as respostas obtidas (mínimo e máximo) das formulações produzidas quanto o tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta e os seus pesos e importâncias para o estudo.

A meta definida para este estudo nas respostas avaliadas foi a minimização, buscando a redução no tamanho de partícula e polidispersão, bem como o aumento na repulsão eletrostática através da redução do potencial zeta. Dentre os parâmetros, conferiu-se peso maior para o tamanho de partícula por ser a resposta mais relevante, seguido da polidispersão e, por fim, do potencial zeta (Tabela 10).

**Tabela 10.** Dados para otimização da formulação.

| Nome                 | Meta              | Limite inferior | Limite superior | Peso | Importância |
|----------------------|-------------------|-----------------|-----------------|------|-------------|
| (A) Emulsionante (%) | Entre o intervalo | 0,2             | 0,3             | 1    | 3           |
| (B) Lipídeo (mg)     | Entre o intervalo | 200             | 300             | 1    | 3           |
| (C) Solvente (mL)    | Entre o intervalo | 0,2             | 0,4             | 1    | 3           |
| (D) Tipo do lipídeo  | Entre o intervalo | TRP             | MEG             | 1    | 3           |
| Tamanho (nm)         | Minimizar         | 100             | 240             | 10   | 5           |
| PI                   | Minimizar         | 0,23            | 0,28            | 5    | 5           |
| $\zeta$ (mV)         | Minimizar         | -19             | -14             | 1    | 5           |

Inúmeras combinações foram realizadas computacionalmente para determinação da formulação de maior desejabilidade. Na Tabela 11 encontram-se os resultados da formulação otimizada, mostrando os componentes da formulação bem como suas concentrações.



**Tabela 11.** Resultado da formulação otimizada.

| <b>Componentes</b>                             | <b>Concentração (%) m/v</b> |
|--|-----------------------------|
| Emulsificante (Polissorbato 80 + Lecitina S75) | 1,50                        |
| Lípido   | 2,22                        |
| Solvente                                       | 3,00                        |
| Tipo de Lípido                                 | TRP                         |
| Diluyente (Tampão PBS)                         | q.s.p. 100,00               |

A formulação predita através do modelo matemático foi executada em triplicata para validação da predição. Os valores teóricos preditos foram muito próximos às respostas dos experimentos executados, comprovando a robustez do delineamento experimental desenvolvido. O tamanho teórico foi de 100 nm, enquanto o experimental foi de 105 nm. A polidispersão teórica foi de 0,23, o experimental 0,22 e Potencial zeta teórico sugerido pelo modelo matemático foi de -16 e o experimental foi de -19. Esta comparação está demonstrada na Tabela 12.

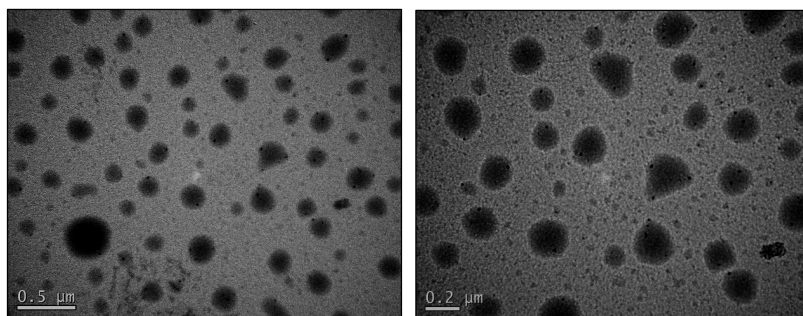
**Tabela 12.** Comparação das respostas das formulações teórica e experimental otimizadas.

| <b>Tamanho (nm)</b> | <b>Tamanho (nm)</b> | <b>PI</b>      | <b>PI</b>           | <b>ζ (mV)</b>  | <b>ζ (mV)</b>       |
|---------------------|---------------------|----------------|---------------------|----------------|---------------------|
| <b>Teórico</b>      | <b>Experimental</b> | <b>Teórico</b> | <b>Experimental</b> | <b>Teórico</b> | <b>Experimental</b> |
| 100                 | 105                 | 0,23           | 0,22                | -16            | -19                 |

### 5.5.1. Morfologia – Microscopia eletrônica de transmissão

Na Figura 20 podem ser visualizadas as fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) da formulação otimizada de nanopartículas lipídicas sólidas. Nestas figuras é possível observar que as nanopartículas são esféricas e compactas, apresentando superfície densa.

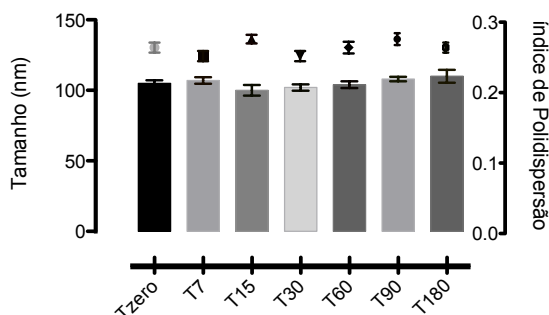
**Figura 20.** Fotomicrografias obtidas por MET da formulação otimizada de nanopartículas lipídicas sólidas.



### 5.5.2. Estudo de estabilidade da formulação de NLS otimizada

A dispersão coloidal otimizada de NLS também foi observada quanto à estabilidade ao longo de 180 dias sob refrigeração (4 °C). Esta avaliação consistiu na medida do diâmetro médio das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta e na observação de variáveis macroscópicas como a tendência de agregação e sedimentação. Na Figura 21, pode ser observado que a formulação otimizada apresentou resultados satisfatórios quanto à estabilidade físico-química.

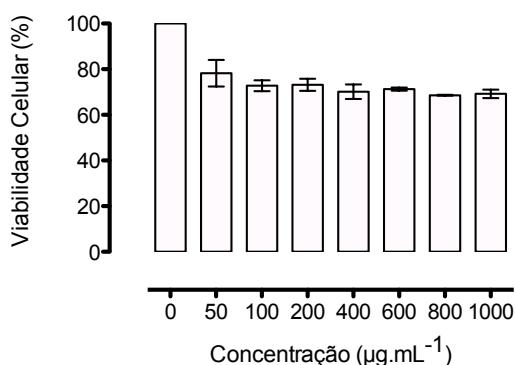
**Figura 21.** Efeito do tempo de armazenamento à temperatura 4 °C sobre o tamanho de partícula e PI da formulação otimizada de NLS (média  $\pm$  DP, n = 3).



### 5.5.3. Estudo de Biocompatibilidade da formulação otimizada

O perfil de citotoxicidade da NLS em fibroblastos foi investigada pelo ensaio MTT em condições *in vitro* (Figura 22). A viabilidade das células NIH/3T3 foi determinada após incubação das células com diferentes concentrações de NLS durante 24 h. Estes resultados estão apresentados na Figura 22. De acordo com a ISP 10993-5, “uma redução de viabilidade celular superior a 30% é considerada citotóxica”. Assim, a formulação otimizada não é considerada citotóxica nas concentrações estudadas e nesta linhagem celular, já que a viabilidade celular foi superior a 75% nas condições de 50 – 1000  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ .

**Figura 22.** Perfil de citotoxicidade da NLS em linhagem celular NIH/3T3 após 24 h de incubação. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT e a densidade ótica do grupo controle sem tratamento foi considerada 100% de viabilidade. Cada barra representa Média  $\pm$  EPM (n=3).



As nanopartículas lipídicas estão atraindo cada vez mais atenção como nanocarreadores coloidais de fármacos para aplicação intravenosa (WANG et al., 2009). A avaliação da atividade hemolítica pode ser mais um indicativo de toxicidade *in vitro* e também pode servir como uma medida simples e de confiança para estimar o dano causado pela formulação (NLS) na membrana *in vivo* (JOSHI et al., 2008). A formulação otimizada não apresentou atividade hemolítica indicando que esta formulação poderá ser útil para carrear fármacos por via parenteral (dados não mostrados).

O delineamento experimental aplicado permitiu formular e otimizar com sucesso formulações de NLS com parâmetros físico-químicos satisfatórios. A influência das variáveis independentes como concentração de

lipídeo sólido e emulsionantes sobre o tamanho, polidispersão e potencial zeta foi avaliada por análise estatística. Foi possível verificar que o tamanho e o índice de polidispersão das partículas produzidas são fortemente dependentes da concentração de lipídeo sólido, aspecto que traduz a tendência da coalescência de fases quando elevadas concentrações são utilizados.

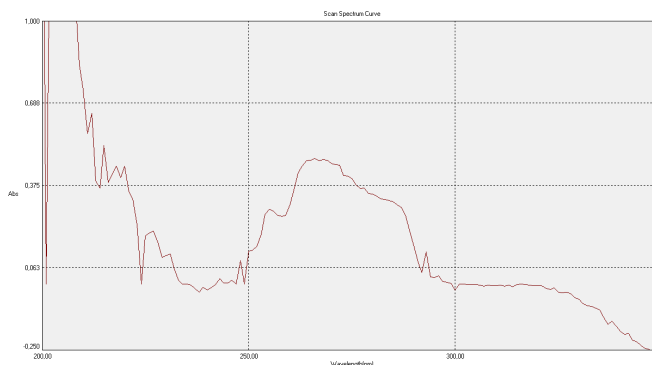
### **5.6. Desenvolvimento e validação do método de doseamento da molécula C<sub>3</sub> nas NLS**

A molécula C<sub>3</sub> (1 - (5, 5, 5-tricloro-2-metoxi-4-oxopenten-2-il)-4-triclorometil-pirimidina-2 (1H)-ona) é inédita e, não existem relatos sobre nenhum método analítico para o doseamento desta molécula em nanocarreadores lipídicos.

Entre os métodos existentes para quantificar a incorporação de fármacos, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é muito utilizada, pois permite a separação, identificação e quantificação dos componentes analisados, além de ser um método que apresenta rapidez de análise, alta eficiência, reprodutibilidade e sensibilidade. Assim, foi necessário desenvolver uma metodologia por CLAE seguida de um estudo de validação do método para esta finalidade.

A validação de uma metodologia tem como objetivo principal assegurar que determinado procedimento analítico selecionado forneça resultados reprodutíveis e confiáveis, que sejam adequados aos fins para os quais tenha sido planejado (GARFIELD, 1994). A validação deve garantir por meio de estudos experimentais que o método atenda às exigências das aplicações analíticas assegurando assim a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003). Os parâmetros de validação selecionados para a quantificação do C<sub>3</sub> nas NLS seguiram as normas de validação conforme critérios estabelecidos pelo ICH (2005) e pelo Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2003). Deste modo, foram avaliados os parâmetros de linearidade, especificidade, precisão, exatidão e limite de detecção e quantificação.

O espectro de varredura UV-VIS foi obtido no intervalo de 200 a 400 nm para verificar o comprimento de onda de maior absorbância da amostra de C<sub>3</sub>. Como demonstrado na Figura 23, o máximo de absorção da molécula C<sub>3</sub> foi 270 nm. Assim, para o desenvolvimento da metodologia analítica, este comprimento de onda foi utilizado para detecção da molécula nas NLS.

**Figura 23.** Espectro de absorção do C<sub>3</sub> na região do ultra-violeta (UV).

A linearidade pode ser definida como a capacidade do método de fornecer resultados que são diretamente proporcionais à concentração da substância na amostra, dentro de um intervalo específico. Esta avaliação é realizada através da elaboração de uma curva analítica e da análise estatística da linearidade através de análise de regressão linear (BRASIL, 2003).

A faixa de linearidade do método foi avaliada através da elaboração de três curvas analíticas contemplando concentrações de 5 a 50 µg de C<sub>3</sub> por mililitro de fase móvel (acetonitrila:água 65:35, v/v). Os valores médios de área para cada concentração, bem como seus respectivos desvios padrão e desvios padrão relativos estão expressos na Tabela 13.

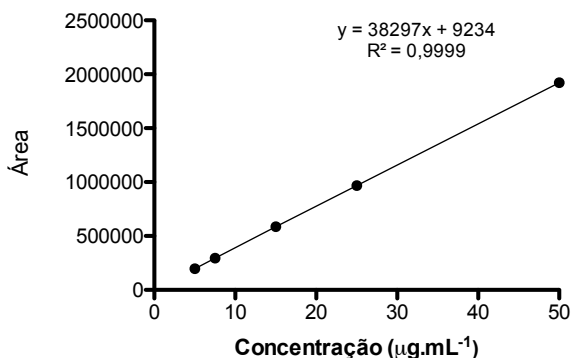
**Tabela 13.** Áreas dos picos médios obtidas após análise das soluções de C<sub>3</sub> por CLAE (n=3).

| Faixa de Linearidade | Área do Pico   | DPR  |
|----------------------|----------------|------|
| (µg/mL)              | (Média ± DP)   | (%)  |
| 5,0                  | 197807 ± 1095  | 0,55 |
| 7,5                  | 295499 ± 412   | 0,14 |
| 15,0                 | 587426 ± 1354  | 0,23 |
| 25,0                 | 968316 ± 2500  | 0,26 |
| 50,0                 | 1922579 ± 5310 | 0,28 |

Dentro dessa faixa, o método demonstrou-se linear, apresentando um coeficiente de correlação de  $R^2 = 0,9999$ , indicando uma ótima correlação

entre os dados, ou seja, o modelo explica 99,99% da variação da área dos picos. A Figura 24 representa a equação da reta obtida por regressão linear, bem como a curva de calibração média utilizada na conversão entre as áreas dos picos dos cromatogramas obtidos e a concentração do analito.

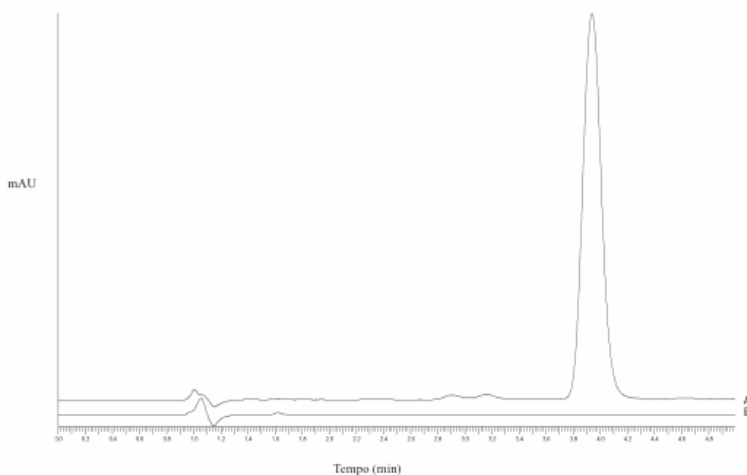
**Figura 24.** Curva de calibração média do C<sub>3</sub> obtida por CLAE e respectiva equação da reta.



A avaliação estatística dos valores obtidos na curva padrão foi realizada por análise de variância (ANOVA). Os resultados obtidos demonstraram que a linearidade é estatisticamente válida, pois a curva apresentou regressão linear significativa ( $p < 0,05$ ). Ainda, não foi detectada a presença de erro sistemático constante, uma vez que a reta passa estatisticamente pelo zero. Assim, o método apresentou linearidade de resposta na faixa de 5,0 a 50 µg.mL<sup>-1</sup>.

A especificidade de um método indica a capacidade em avaliar sem equívoco o analito de interesse, mesmo em presença de outras substâncias como impurezas, produtos de degradação e excipientes (ICH, 2005). Neste estudo, para a avaliação da especificidade do método, NLS brancas foram dissolvidas na fase móvel e posteriormente filtradas em filtro de membrana de 0,45 µm de poro. Esta solução foi injetada no cromatógrafo a fim de demonstrar que nenhum componente da formulação de NLS absorve no mesmo comprimento de onda utilizado para as análises do C<sub>3</sub> ( $\lambda = 270$  nm). Com base no cromatograma apresentado na Figura 25, observa-se que não há interferência dos componentes da formulação, indicando que o método é específico.

**Figura 25.** (A) Cromatograma da formulação de NLS branca contaminada com C<sub>3</sub> (B) Cromatograma da formulação de NLS branca.



A precisão do método é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003). A repetibilidade e a precisão intermediária foram caracterizadas por coeficientes de variação inferiores a 0,23 e 0,93 %, respectivamente, demonstrando que o método proposto é preciso. O cromatograma obtido com a concentração de  $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , utilizada para o estudo da precisão, está demonstrado na Figura 25. Os resultados das análises intra e inter-dia são apresentados na Tabela 14.

A exatidão de um método analítico corresponde à proximidade entre os resultados obtidos por um determinado método e o valor verdadeiro. A exatidão pode ser avaliada através de amostras contendo quantidades conhecidas da substância referência, podendo ser expressa como porcentagem de recuperação (BRASIL, 2003; ICH, 2005). O teste de recuperação foi utilizado para a verificação da exatidão do método proposto, sendo que todos os valores experimentais obtidos encontravam-se dentro dos limites aceitáveis (95-105%) de recuperação (Tabela 15), demonstrando assim, que o método é exato.

**Tabela 14.** Valores experimentais médios obtidos durante o estudo da precisão do método (n=6).

|                         | Amostra<br>Teórica ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) | Amostra<br>Experimental<br>( $\mu\text{g.mL}^{-1} \pm \text{DP}$ ) | Recuperação<br>(%) | DPR<br>(%) |
|-------------------------|--|--|--------------------|------------|
| <b>Intra-dia</b>        |  |  |                    |            |
| <b>Dia 1 (n=6)</b>      | 15,0   | 15,08 $\pm$ 0,04   | 100,52 $\pm$ 0,23  | 0,23       |
| <b>Dia 2 (n=6)</b>      | 15,0   | 14,75 $\pm$ 0,14   | 98,33 $\pm$ 0,91   | 0,93       |
| <b>Dia 3 (n=6)</b>      | 15,0   | 14,81 $\pm$ 0,10   | 98,71 $\pm$ 0,63   | 0,64       |
| <b>Inter-dia (n=18)</b> | 15,0   | 14,89 $\pm$ 0,18   | 99,25 $\pm$ 1,21   | 1,22       |

A metodologia de quantificação de  $C_3$  foi avaliada em relação à sensibilidade através da determinação dos limites de detecção e quantificação. O limite de detecção pode ser definido como a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, enquanto que o limite de quantificação representa a menor concentração de substância analisada que pode ser determinada com precisão e exatidão (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Neste contexto, a determinação do limite de detecção e quantificação foi calculada com base no desvio padrão da resposta e inclinação da curva de calibração. O limite de detecção e de quantificação foi de 0,073  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 0,22  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente.

**Tabela 15.** Valores de recuperação (%) obtidos após adicionar diferentes concentrações de  $C_3$  ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) em uma NLS branca (n=3).

| Amostra | Amostra de $C_3$                  |  | Recuperação       |
|---------|-----------------------------------|--|-------------------|
|         | Teórica ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) | Experimental ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) | (% $\pm$ DP)      |
| NLS     | 7,5                               | 7,37                                   | 98,28 $\pm$ 0,15  |
|         | 15                                | 14,51                                  | 96,76 $\pm$ 0,58  |
|         | 25                                | 25,03                                  | 100,12 $\pm$ 0,12 |

### 5.7. Incorporação do Composto $C_3$ na formulação otimizada de NLS

Estudos prévios demonstrados por Winter e colaboradores (2014), demonstraram que o análogo de pirimidina ( $C_3$ ) tem alta citotoxicidade *in vitro* sobre linhagem celular de leucemia, e testes preliminares apresentaram baixa



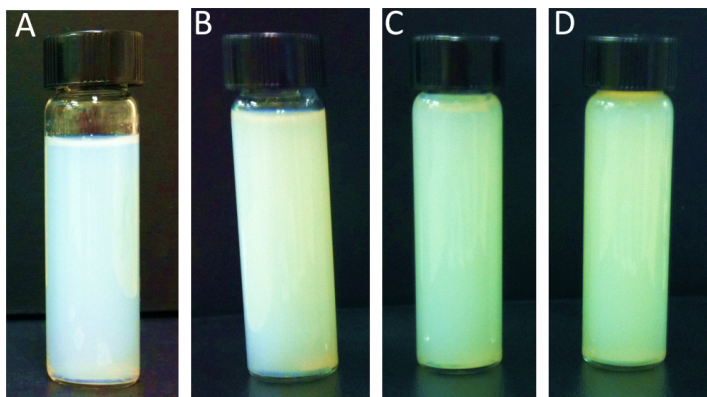
solubilidade em água ( $1,13 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), o que dificultaria a administração parenteral além de dificultar a realização de testes *in vitro* e *in vivo*. Através dos estudos de formulação bem como o delineamento experimental, uma formulação foi otimizada, a qual apresentou bons resultados quanto as propriedades físico-químicas e citotóxicas em células não-tumorais. Estas propriedades físico-químicas viabilizam o uso da formulação como nanocarreador da molécula  $\text{C}_3$ .

A administração via parenteral de moléculas bioativas com reduzida hidrossolubilidade representa um grande desafio no desenvolvimento de medicamentos. Algumas estratégias são descritas na literatura para esta finalidade, como a modificação do pH do veículo, adição de cossolventes, formação de complexos com ciclodextrinas e a utilização da nanotecnologia (STRICKLEY, 2004, WISSING, KAYSERB, MÜLLER, 2004, MEHNERT E MADER, 2012). A nanotecnologia oferece potenciais e promissores progressos no domínio da saúde e da medicina (ETHERIDGE et al., 2013).

### 5.7.1. Caracterização físico-química das formulações

As suspensões coloidais preparadas foram caracterizadas quanto aos aspectos macroscópicos, os quais estão apresentados na Figura 26. Como pode ser observado, todas as formulações apresentaram efeito *tyndall*, característico de suspensões coloidais e ausência de indicadores de instabilidade como cristais da molécula encapsulada, cremagem ou aglomerados e sedimentos.

**Figura 26.** Caracterização macroscópica das formulações (A) NLS branca (B) NLS  $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (C) NLS  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (D) NLS  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .



A completa ausência de agregados ou sedimentos indicou que nas concentrações avaliadas a molécula em estudo foi solubilizada na fase oleosa da nanopartícula e que a quantidade de emulsionantes garantiu a completa formação dos nanocarreadores. A formulação de NLS branca apresentou coloração branca e as demais formulações apresentaram coloração amarela, e, dependendo da concentração de pirimidina incorporada ( $250 - 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) no nanocarreador, a intensidade da cor foi levemente intensificada, como mostra na Figura 26.

Na Tabela 16 é possível observar as características físico-químicas como o tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação das nanopartículas lipídicas sólidas preparadas na ausência e na presença de diferentes quantidades de  $\text{C}_3$  ( $250$ ,  $500$  e  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

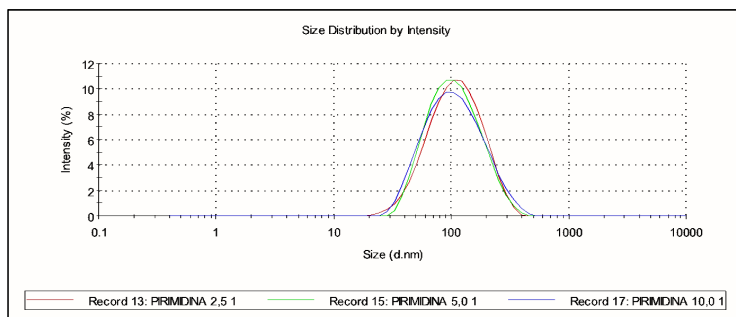
**Tabela 16.** Caracterização físico-química das NLS ( $n = 3$ ).

| Formulação        | Tamanho de Partícula (nm) | Índice de Polidispersão | Potencial Zeta (mV) | Eficiência de Encapsulação (%) |
|-------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------|--------------------------------|
| <b>NLS branca</b> | $105 \pm 3,6$             | $0,22 \pm 0,006$        | $-19 \pm 2,83$      | —                              |
| <b>NLS 250</b>    | $100 \pm 3,5$             | $0,21 \pm 0,001$        | $-31 \pm 1,41$      | $97 \pm 3,59$                  |
| <b>NLS 500</b>    | $103 \pm 5,6$             | $0,21 \pm 0,001$        | $-31 \pm 0,70$      | $99 \pm 2,19$                  |
| <b>NLS 1000</b>   | $103 \pm 6,3$             | $0,21 \pm 0,001$        | $-43 \pm 4,24$      | $98 \pm 6,01$                  |

A comparação entre o diâmetro das nanopartículas com ausência do  $\text{C}_3$  (NLS branca) e o diâmetro das NLS contendo  $\text{C}_3$  em diferentes concentrações permitiu observar que a encapsulação da molécula  $\text{C}_3$  não afeta o diâmetro médio das partículas ( $p < 0,05$ ), assim como demonstrado na Figura 27, que mostra a distribuição de tamanho das NLS na presença de diferentes concentrações de  $\text{C}_3$  incorporadas na formulação de NLS.

O índice de polidispersão (PI) fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos das partículas de um determinado sistema. Quanto menor o seu valor, mais monodispersa é a população de partículas, o PI é 0,00 para dispersões idealmente monodispersas, aproximadamente de 0,10 para distribuições estreitas e de 0,50 para distribuições muito amplas (LIU; WU, 2010). Dada à natureza geralmente polidispersa dos sistemas de NLS, valores de PI inferiores a 0,30 têm sido considerados como valores bastante aceitáveis para estes sistemas (DAS; CHAUDHURY, 2011; KHURANA, BEDI, JAIN, 2013). O PI de todas as formulações avaliadas foi menor que 0,22, o que sugere sistemas monodispersos no que se refere às NLS (Tabela 16).

**Figura 27.** Distribuição de tamanho das NLS na presença de diferentes quantidades de C<sub>3</sub> encapsuladas (vermelho 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; verde 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; azul 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).



O índice de polidispersão (PI) fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos das partículas de um determinado sistema. Quanto menor o seu valor, mais monodispersa é a população de partículas, o PI é 0,00 para dispersões idealmente monodispersas, aproximadamente de 0,10 para distribuições estreitas e de 0,50 para distribuições muito amplas (LIU; WU, 2010). Dada à natureza geralmente polidispersa dos sistemas de NLS, valores de PI inferiores a 0,30 têm sido considerados como valores bastante aceitáveis para estes sistemas (DAS; CHAUDHURY, 2011; KHURANA, BEDI, JAIN, 2013). O PI de todas as formulações avaliadas foi menor que 0,22, o que sugere sistemas monodispersos no que se refere às NLS (Tabela 16).

Os fosfolípidos, os polissorbato e os diferentes lipídeos constituintes das nanopartículas são os principais componentes presentes nas formulações capazes de influenciar o potencial zeta. Os fosfolípidos, como a lecitina S75 utilizada nesse trabalho, fornecem um potencial negativo à interface, enquanto que os polissorbato tendem a reduzir o valor absoluto deste parâmetro. As características superficiais da partícula podem influenciar tanto a estabilidade físico-química quanto a resposta biológica da molécula associada (GREF, COUVREUR, 2006).

O valor de potencial zeta (PZ) encontrado indicou a obtenção de partículas de carga negativa, devido à utilização de lecitina como emulsionante anfótero, sendo observada uma redução nos valores de carga superficial nas NLS, provavelmente devido à presença de maiores concentrações de polissorbato 80, um emulsionante não iônico, na interface das partículas. Houve variações nos valores do potencial zeta das

formulações preparadas com a molécula  $C_3$  ( $P < 0,05$ ), o que indica a existência de algum efeito da quantidade inicial de fármaco sobre a carga superficial das partículas e a possibilidade de adsorção do  $C_3$  na superfície da NLS.

A determinação da quantidade de fármaco associada às nanopartículas é especialmente complexa devido ao tamanho reduzido destas, que dificulta a separação da fração de fármaco livre da fração associada. Uma técnica amplamente utilizada para este fim é a ultrafiltração/centrifugação, na qual uma membrana é empregada para separar a fase aquosa dispersante da suspensão coloidal. A concentração livre do fármaco é determinada no ultrafiltrado. Por conseguinte, a fração de fármaco associada às nanoestruturas é calculada pela diferença entre as concentrações de fármaco total e livre (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Após a validação do método analítico e análise das suspensões coloidais por CLAE, a concentração total e a eficiência de encapsulação do  $C_3$  foram estimados. A eficiência de encapsulação foi maior que 98% para todas as formulações desenvolvidas, demonstrando que a maior parte da molécula  $C_3$  encontra-se associada ao nanocarreador. Estes valores encontram-se na Tabela 16. Os resultados obtidos revelaram a alta capacidade de incorporação de uma molécula pouco solúvel, em água, no sistema de NLS desenvolvido, o que viabilizaria a administração parenteral.

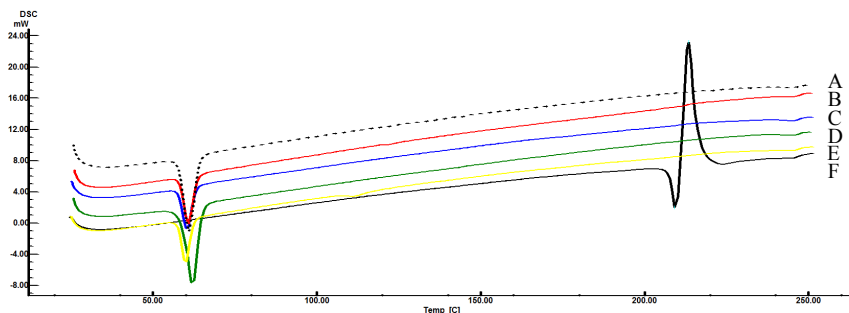
### **5.7.2. Análise das NLS por Calorimetria Exploratória Diferencial**

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é frequentemente usada para proporcionar informações sobre as propriedades físicas e energéticas de um composto ou formulação. DSC mede a perda ou ganho de calor resultante de mudanças físicas ou químicas dentro da amostra como função da temperatura (GIRON, 2002).

Na Figura 28, que mostra as curvas DSC (F), o análogo de pirimidina apresentou um evento endotérmico em 209 °C, característico de fusão, seguido de um grande evento exotérmico em 214 °C característico de degradação. Nas curvas (A, B e C) da Figura 28 são as NLS contendo  $C_3$  em diferentes concentrações de encapsulação e é possível observar que os eventos característicos do  $C_3$  desaparecem. Este desaparecimento é devido à obtenção de uma matriz lipídica homogênea indicando que o sistema utilizado foi capaz de incorporar a molécula  $C_3$  no núcleo das NLS. Todas as amostras analisadas por DSC, exceto a amostra da molécula  $C_3$ , apresentaram um evento endotérmico característico do ponto de fusão da matriz lipídica

utilizada, a tripalmitina. Este evento ocorreu próximo a 63 °C, confirmando dados de literatura (HELGASON et al., 2009).

**Figura 28.** Termogramas por calorimetria exploratória diferencial. (A) NLS-1000; (B) NLS-500; (C) NLS-250; (D) Tripalmitina; (E) NLS branca; (F) molécula C<sub>3</sub>.



### 5.7.3. Desenvolvimento do método de Liberação do C<sub>3</sub> a partir das NLS *in vitro*

#### 5.7.3.1. Determinação da solubilidade de C<sub>3</sub> em diferentes meios de dissolução

A solubilidade de um fármaco é parâmetro chave nos estudos de dissolução e/ou liberação de formas farmacêuticas. Assim, estabelecer condições *sink* no sistema é de extrema importância.

O termo condições *sink* é definido como não menos que três vezes o volume de meio necessário para obter uma solução saturada do fármaco (MARQUES; BROWN, 2002; PHARMACOPEIAL FÓRUM, 2004). Aceita-se também um volume de 5-10 vezes o necessário para saturação seja suficiente para manter as condições *sink*. As condições *sink* são desejáveis a fim de evitar que a velocidade de dissolução seja influenciada, artificialmente, pela aproximação da saturação durante a realização do teste, porém, não são obrigatórias (MARQUES; BROWN, 2002).

Condições *sink* não foram atingidas com água, PBS ou PBS acrescido do tensoativo polissorbato 20 ou 80 na concentração de 5% (p/v). No entanto, a adição ao meio do co-solvente propilenoglicol, na concentração de 50 % (v/v), promoveu o aumento da solubilidade de C<sub>3</sub>. Assim a solução de polissorbato 80 a 5% acrescida de propilenoglicol permitiu obter

condições *sink* desejadas para este estudo. Esses resultados podem ser visualizados na Tabela 17.

**Tabela 17.** Solubilidade do C<sub>3</sub> nos meios avaliados, expressa como concentração de saturação.

| Meio Avaliado   | Concentração de C <sub>3</sub><br>( $\mu\text{g.mL}^{-1} \pm \text{DP}$ ) |
|---|---|
| Água  | 1,13 $\pm$ 0,01   |
| PBS   | 0,62 $\pm$ 0,02   |
| Água : Propilenoglicol (50:50) (v/v)                              | 7,00 $\pm$ 0,52   |
| Solução de polissorbato 80 5% (p/v)                               | 15,00 $\pm$ 0,81  |
| Solução de 5 % de polissorbato 80 : Propilenoglicol (50:50) (v/v) | 51,01 $\pm$ 1,37  |
| Solução de polissorbato 20 5% (p/v)                               | 5,00 $\pm$ 0,19   |

#### 5.7.3.2. Validação do método de liberação do C<sub>3</sub> incorporado em NLS

Para a realização do estudo de liberação se faz necessária a escolha de uma metodologia analítica capaz de detectar baixas concentrações do fármaco no meio de liberação. Assim, a cromatografia líquida de alta eficiência foi escolhida.

A fim de garantir a confiabilidade dos resultados do estudo de liberação do C<sub>3</sub> *in vitro*, alguns parâmetros de validação foram revalidados, conforme descrito abaixo.

#### 5.7.3.3. Linearidade

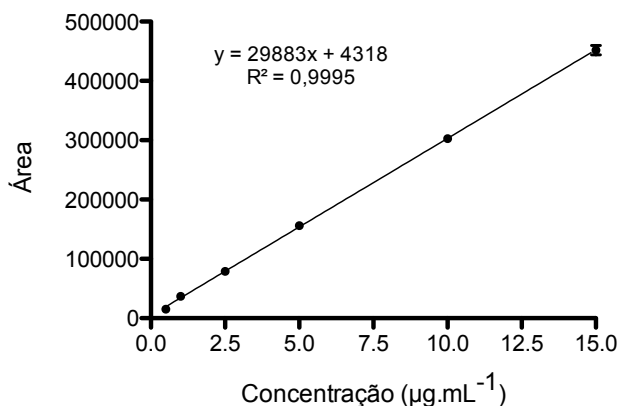
Dentro da faixa de concentração escolhida (0,5-15,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), o método demonstrou-se linear, nas três curvas construídas, apresentando um coeficiente de correlação médio de 0,9995. A Figura 29 representa a curva de calibração média, bem como a equação da reta obtida por regressão linear utilizada na conversão entre as áreas dos picos dos cromatogramas obtidas e a concentração do analito.

Na Tabela 18, estão representados os valores experimentais médios obtidos das áreas absolutas utilizadas para a construção da curva de calibração.

**Tabela 18.** Áreas dos picos médios obtidas após análise das soluções de C<sub>3</sub> por CLAE (n=3).

| Faixa de Linearidade | Área do Pico      | DPR  |
|----------------------|-------------------|------|
| ( $\mu\text{g/mL}$ ) | (Média $\pm$ DP)  | (%)  |
| 0,5                  | 15381 $\pm$ 681   | 4,43 |
| 1,0                  | 36725 $\pm$ 474   | 1,29 |
| 2,5                  | 78971 $\pm$ 2147  | 2,72 |
| 5,0                  | 156057 $\pm$ 1026 | 0,66 |
| 10                   | 302835 $\pm$ 1728 | 0,57 |
| 15,0                 | 451979 $\pm$ 7966 | 1,76 |

**Figura 29.** Curva de calibração média da molécula C<sub>3</sub> obtida por CLAE e sua respectiva equação da reta.

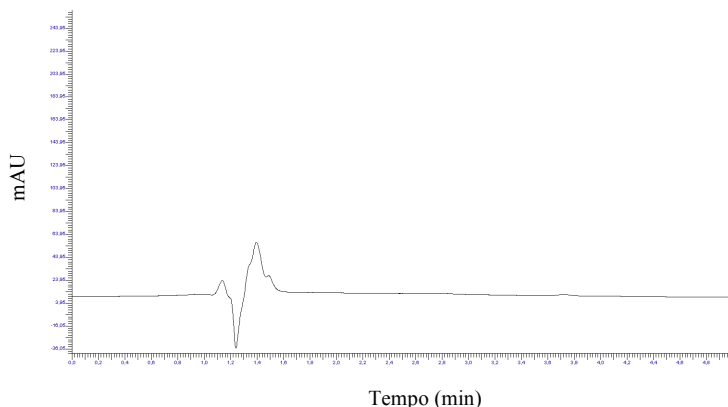


#### 5.7.3.4. Especificidade frente à composição do meio de dissolução

O cromatograma obtido com a análise do meio de dissolução (Solução de 5 % de polissorbato 80 : Propilenoglicol (50:50) (v/v)) não apresentou interferentes na região de retenção da molécula C<sub>3</sub>, nas condições empregadas, como pode ser verificado pela Figura 30. Assim, o método

demonstrou-se específico, uma vez que nenhum componente do meio de dissolução interferiu na quantificação da molécula C<sub>3</sub>.

**Figura 30.** Cromatograma típico obtido por CLAE do meio de dissolução (Solução de 5 % de polissorbato 80 : Propilenoglicol (50:50) (v/v)).



#### 5.7.3.5. Limite de quantificação e Limite de Detecção

O limite de quantificação, calculado através da fórmula preconizada pelo ICH (2005), foi estabelecido com o objetivo de garantir que a faixa de trabalho escolhida está dentro da faixa de concentração quantificável pelo método. Os limites de quantificação e detecção calculados foram de 0,43  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 0,14  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente.

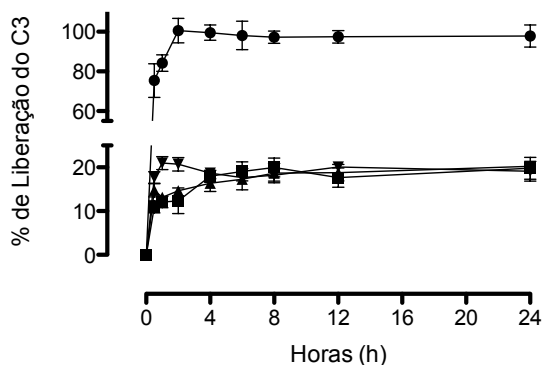
#### 5.7.4. Estudo de Liberação do C<sub>3</sub> *in vitro*

O experimento foi executado sob condições *sink* para garantir a solubilização do C<sub>3</sub> total no meio de dissolução composto por solução de 5 % de polissorbato 80 e propilenoglicol (50:50, v/v). Como pode ser observado na Figura 31, que mostra o perfil de liberação do C<sub>3</sub> incorporado em diferentes concentrações em NLS, a liberação de até 20 % do C<sub>3</sub> nas primeiras 2 horas nas três formulações avaliadas pode ser atribuída à adsorção do ativo na superfície das nanopartículas. Este mesmo perfil de liberação também é observado em diferentes trabalhos utilizando NLS e moléculas lipofílicas (DAS et al., 2012; WANG et al., 2009; PANDITA et al., 2014). Como um controle, o C<sub>3</sub> livre apresentou completa dissolução em



2 horas, evidenciando que os sistemas de NLS desenvolvidos são capazes de controlar a liberação da molécula encapsulada.

**Figura 31.** Perfil de liberação *in vitro*. (●) C<sub>3</sub> livre; (■) NLS-250; (▲) NLS-500; (▼) NLS-1000. (média ± DP, n = 3).



Como pode ser observada na Figura 31, que mostra o perfil de liberação do C<sub>3</sub> incorporado em diferentes concentrações em NLS, a liberação de até 20 % do C<sub>3</sub> nas primeiras 2 h nas três formulações avaliadas pode ser atribuída à adsorção do ativo na superfície das nanopartículas. Este mesmo perfil de liberação também é observado em diferentes trabalhos utilizando NLS e moléculas lipofílicas (DAS et al., 2012; WANG et al., 2009; PANDITA et al., 2014). Como um controle, o C<sub>3</sub> livre apresentou completa dissolução em 2 h, evidenciando que os sistemas de NLS desenvolvidos são capazes de controlar a liberação da molécula encapsulada.

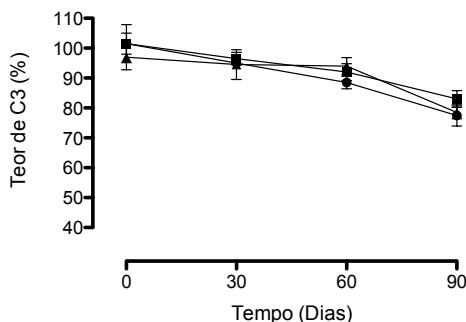
NLS é uma matriz lipídica, sólida à temperatura ambiente e corporal, o que dificulta a liberação de ativos lipossolúveis como é o caso da molécula estudada neste trabalho. Zur Mühlen e colaboradores (1998) demonstraram que a mobilidade de fármacos incorporados em NLS é reduzida, dificultando a liberação do fármaco. Pandita e colaboradores (2014) utilizaram NLS para encapsular resveratrol e confirmaram uma liberação sustentada com baixa liberação de resveratrol nas primeiras horas de estudo, necessitando 120 h de ensaio para liberar 80 % do ativo a partir das NLS.

### 5.7.5. Estudo de Estabilidade

No estudo de estabilidade das formulações não foram encontradas diferenças significativas de propriedades físico-químicas, como tamanho,

índice de polidispersão e potencial zeta, porém a concentração do C<sub>3</sub> diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) em função do tempo como demonstra a Figura 32.

**Figura 32.** Perfil de degradação do C<sub>3</sub> em função do tempo. (●) NLS-250; (■) NLS-500; (▲) NLS-1000. (média  $\pm$  DP,  $n = 3$ ).



Foi possível observar (Figura 32) a partir de 30 dias de armazenamento a presença de agregados e/ou sedimentos contendo cristais da molécula, indicando que o sistema NLS expulsou a molécula de sua estrutura como é descrito na literatura como uma desvantagem do uso de NLS. De acordo com Souto e Müller (2006), ao longo do tempo de armazenamento, a estrutura cristalina da nanopartícula inicial pode mudar para outras formas polimórficas mais estáveis, levando à expulsão da molécula da matriz lipídica pela formação dessas estruturas. Ao realizar o doseamento destas NLS nos diferentes tempos de estudo de estabilidade, as formulações após 30 dias de armazenamento apresentaram um decaimento contínuo, chegando aos 90 dias com um teor de cerca de 80%.

Dessa forma, uma estratégia interessante foi liofilizar as nanopartículas para implementar a estabilidade química e física das formulações de NLS por um longo período de tempo. A transformação em uma forma sólida irá impedir as instabilidades comumente ocasionadas em soluções aquosas.

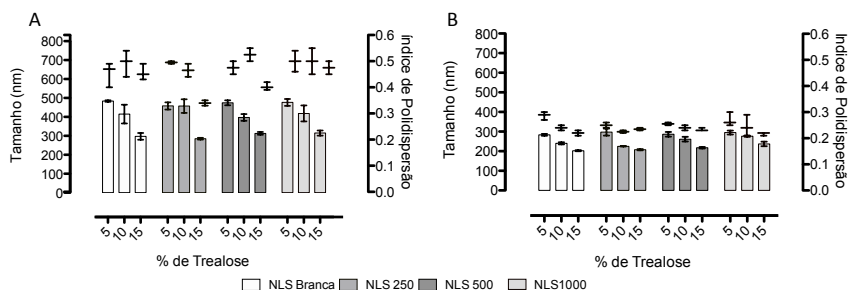
#### 5.7.6. Estudo de Liofilização das NLS

A aplicabilidade industrial de NLS em meio aquoso pode ser limitada, devido aos problemas de baixa estabilidade físico-química em

períodos de armazenamento prolongados. As principais limitações são a agregação das partículas, a estabilidade química do fármaco ou de outras matérias-primas e, ainda, a liberação prematura da substância ativa o que foi observado neste estudo. Além disso, é importante enfatizar que formas farmacêuticas líquidas são propensas à proliferação microbiana, havendo a necessidade de adição de conservantes.

A liofilização é um método de secagem baseado na sublimação da água e vem sendo utilizado com sucesso na secagem de sistemas nanoestruturados. No entanto, a utilização desta técnica usualmente exige a presença de crioprotetores, e o número de substâncias com esta finalidade em diferentes concentrações estudadas em inúmeros trabalhos demonstra a dificuldade de sucesso na liofilização dos nanocarreadores (ZIMMERMANN, MÜLLER, MADER, 2000; LI et al., 2008; GUAN et al., 2011; AYEN, KUMAR, 2012).

**Figura 33.** Tamanho da partícula (nm) *versus* quantidade de trealose (%) após estudo de liofilização. (A) Ressuspensão com agitação manual; (B) Ressuspensão com banho de ultrassom por 5 min. (média  $\pm$  DP, n = 3).



Um estudo de liofilização foi realizado utilizando como crioprotetor o açúcar trealose em concentração de 5, 10 e 15%. Os açúcares, de modo geral, formam uma matriz contendo pequenos cristais em torno das nanopartículas, que após a liofilização resulta em um material com porosidade homogênea. Assim, esta porosidade favorece a reconstituição das nanopartículas pela facilidade de reintrodução da água no processo de ressuspensão (ABDELWAHED et al., 2006). Neste estudo ficou evidenciado que a trealose foi fundamental para a ressuspensão da formulação, pois as formulações submetidas à liofilização sem o crioprotetor, não foram passíveis de ressuspensão. Todas as formulações com ou sem o C<sub>3</sub> apresentaram o mesmo perfil de ressuspensão quando liofilizadas com trealose (Figura 33).

A ressuspensão com auxílio do banho de ultrassom é menos conveniente e prática para aplicação na clínica médica do que, por exemplo, a agitação manual. Porém, uma investigação da melhor maneira de ressuspensão foi analisada. Com o auxílio do banho de ultrassom a manutenção do tamanho das nanopartículas foi aceitável e o índice de polidispersão se manteve. Embora o tamanho tenha aumentado em cerca de 100 %, este tamanho ainda é considerado aceitável para administração parenteral.

A literatura mostra que grandes quantidades de crioprotetor são necessárias para manter as características iniciais da formulação, após a liofilização. Em um estudo de liofilização de lipossomas realizado por JOSHI e MISRA (2001) a proporção mais efetiva para preservação das partículas foi 1:10 (lipídeo/açúcar). Del Pozo-Rodrigues e colaboradores (2008) liofilizaram nanopartículas lipídicas sólidas contendo DNA com diferentes concentrações de trealose. Apesar da obtenção de pós com o uso de trealose de 5 – 40 %, as partículas liofilizadas não apresentaram manutenção de tamanho, e o índice de polidispersão após o processo não foi apresentado.

Adicionalmente, foi realizada a verificação do teor do C<sub>3</sub> em função do período de armazenamento (0, 30, 60 e 90 dias). As formulações estudadas permaneceram com o mesmo teor inicial indicando que o processo de liofilização consiste em uma estratégia interessante para a inibição da degradação e expulsão da molécula de C<sub>3</sub> da NLS. A comparação da formulação liofilizada *versus* formulação não liofilizada em função do tempo, armazenadas em temperatura ambiente, se encontra na Tabela 19.

**Tabela 19.** Comparação do estudo de estabilidade em função do tempo (média  $\pm$  DP, n = 3).

| Tempo | NLS-250         |             | NLS-500         |             | NLS-1000        |             |
|-------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|
|       | Não Liofilizado | Liofilizado | Não Liofilizado | Liofilizado | Não Liofilizado | Liofilizado |
| Tzero | 101 $\pm$ 3     | 100 $\pm$ 1 | 101 $\pm$ 6     | 100 $\pm$ 0 | 105 $\pm$ 1     | 103 $\pm$ 2 |
| T30   | 95 $\pm$ 2      | 98 $\pm$ 2  | 97 $\pm$ 3      | 100 $\pm$ 0 | 103 $\pm$ 1     | 103 $\pm$ 0 |
| T60   | 85 $\pm$ 3      | 101 $\pm$ 5 | 92 $\pm$ 3      | 102 $\pm$ 1 | 94 $\pm$ 3      | 105 $\pm$ 0 |
| T90   | 77 $\pm$ 4      | 101 $\pm$ 3 | 83 $\pm$ 3      | 102 $\pm$ 4 | 78 $\pm$ 2      | 105 $\pm$ 0 |

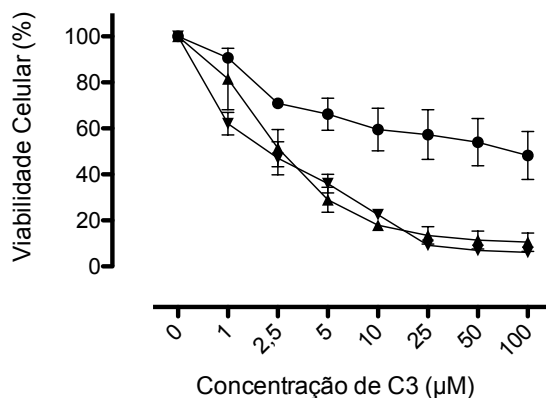
### 5.7.7. Estudo de Citotoxicidade (L1210)

A Figura 34 demonstra o perfil de citotoxicidade da molécula livre e encapsulada bem como a NLS sem o ativo (NLS branca). Este ensaio foi realizado pelo método MTT em condições *in vitro* após incubação das células

L1210 com as formulações durante 24 h. Neste ensaio a formulação utilizada foi a NLS-1000.

A formulação de NLS branca nas concentrações estudadas é considerada citotóxica na linhagem celular L1210, porém em linhagem celular NIH-3T3, como demonstrado no item 5.5.3, a formulação não apresentou citotoxicidade. Este resultado pode ser atribuído a maior seletividade que o nanocarreador apresentou por células neoplásicas.

**Figura 34.** Viabilidade celular em células L1210. (●) NLS branca; (▲) C<sub>3</sub> livre; (▼) C<sub>3</sub>-NLS. As células ( $1 \times 10^5$ ) foram incubadas por 24 h e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Cada ponto representa Média  $\pm$  EP (n=3).



Esta seletividade pode ser devido ao fato de células leucêmicas apresentarem maior fluidez na membrana plasmática sendo mais suscetíveis a captação de substâncias. Desta maneira, podemos sugerir que a captação celular em células L1210 foi maior, provocando uma maior citotoxicidade quando comparada com células não tumorais 3T3-NIH.

Outro dado relevante deste estudo é que quando a molécula C<sub>3</sub> foi encapsulada a citotoxicidade foi a mesma àquela apresentada pela molécula livre evidenciando a mesma característica de citotoxicidade da molécula não encapsulada (livre). Assim, as NLS com o C<sub>3</sub> incorporado viabiliza a administração parenteral e torna este sistema adequado para testes *in vivo*.

### **5.8. Comparação do método de produção de NLS**

Para introduzir um novo produto no mercado, são necessárias diversas etapas de pesquisa e desenvolvimento. No decurso do desenvolvimento de uma série de refinamentos progressivos nas formulações, processos de fabricação e de apresentação dos produtos são importantes. A fase de aumento de escala inclui a integração dos procedimentos, bem como a transferência de tecnologia, para realizar a produção em grande escala de um determinado produto. Esta fase do desenvolvimento é crucial por que, frequentemente, muitas das limitações do processo que não são aparentes em pequena escala tornam-se significativas frente a uma escala maior, podendo conduzir à falha de uma unidade de tradução às dimensões industriais.

Assim foi realizada a comparação das características físico-químicas das NLS produzidas pela técnica ultrassonicação e pela técnica de homogeneização de alta pressão, no sentido de verificar a possibilidade de escalonamento da formulação desenvolvida. Todos os estudos sobre as formulações de NLS foram realizadas em paralelo, a fim de comparar-se os resultados e concluir sobre as vantagens e limitações de ambas as técnicas e viabilizar o escalonamento da formulação desenvolvida neste trabalho.

Existem várias técnicas para produção de formulações de NLS e as duas principais são a utilização de homogeneizador de alta pressão e a técnica de microemulsão. Alternativamente, outras técnicas são utilizadas para obtenção de NLS e um método simples comumente utilizado na comunidade científica é a ultrassonicação.

Durante o processo de fabricação, muitos parâmetros parecem ter uma influência marcante sobre as propriedades físico-químicas das NLS. Entre eles podemos citar a técnica empregada na produção de nanopartículas.

A técnica de homogeneização em alta pressão (HAP) foi desenvolvida por MÜLLER e LUCK em 1996 (patente Européia número 0605497) para a preparação de nanoemulsões para nutrição parenteral em grande escala. O equipamento funciona puxando o líquido em alta pressão (100 – 2.000 bar), por um pistão estreito, de tamanho manométrico, o qual é acelerado em uma pequena distância a uma alta velocidade, atingindo mais de 1000 Km/h). Este fluido é, portanto, submetido a um grande estresse, em que forças de cavitação rompem as gotículas, gerando as nanogotículas (MEHNERT, MADER, 2012).

Na obtenção das NLS, o homogeneizador de alta pressão pode ser alimentado com a dispersão de lipídeos e fármaco a quente ou a frio. No processo a quente, uma pré-emulsão é obtida e passada no homogeneizador e posteriormente resfriada a temperatura ambiente dando origem às NLS. No

processo a frio a dispersão do fármaco no lipídeo é inicialmente solidificada em nitrogênio líquido, moída, o pó é disperso diluído com o auxílio de um emulsionante e só então submetido à homogeneização (MEHNERT, MADER, 2012).

A maior vantagem da técnica de homogeneização à alta pressão é a possibilidade de produção das nanopartículas em larga escala, além de produzir estreita faixa de diâmetro de partículas e de não utilizar solvente orgânico (HU et al., 2006). As NLS produzidas por homogeneização à quente produz, em geral, partículas com tamanhos abaixo de 500 nm (ÜNER, 2006).

A influência do tipo de homogeneizador, da pressão aplicada, do número de ciclos empregados e da temperatura no tamanho das partículas obtidas tem sido exaustivamente estudada. Aplicando a técnica de homogeneização à alta pressão é possível trabalhar com concentrações de lipídeo acima de 40 % e, geralmente, com uma faixa estreita de distribuição de tamanhos de partícula, com um índice de polidispersividade inferior a 0,20 (WISSING et al., 2004). As vantagens da técnica de homogeneização de alta pressão incluem as possibilidades de aumento de escala, a ausência de solventes orgânicos e a produção de partículas de pequeno diâmetro, com um índice de polidispersão baixo, caracterizando sistemas monodispersos.

A utilização da técnica de ultrassonificação para produção de NLS é interessante pelo fato de que o equipamento é comum em todos os laboratórios e a produção pode ser realizada facilmente. A desvantagem encontrada nesta técnica é a utilização de quantidade mínima de lipídeos (< 3%) para obtenção de NLS por irradiação ultrassônica. Isto é devido ao aumento de viscosidade do sistema com aumento da concentração de lipídeo inviabilizando a homogeneização por esta técnica. Outra desvantagem é a produção de NLS com dimensões heterogêneas (ELDEM, 1991). Além disso, o uso da sonda de ultrassom é sempre acompanhado por um risco de contaminação por titânio (material da sonda) (WISSING, KAYSER, MÜLLER, 2004).

A título de comparação, a formulação otimizada (cuja composição está descrita na Tabela 11, página 112) foi preparada pelos dois métodos mais utilizados para a preparação de NLS, a ultrassonificação e a homogeneização a alta pressão.

No caso da formulação obtida por ultrassonificação, o volume produzido foi de 10 mL e a formulação obtida por homogeneização de alta pressão o volume atingido foi de 500 mL.

**Tabela 20.** Caracterização físico-química dos sistemas nanoestruturados lipídicos (n = 3) produzidos pela técnica de homogeneização à alta pressão.

| Número de Ciclos | Tamanho (nm) | PI          | Potencial Zeta |
|------------------|--------------|-------------|----------------|
| 1                | 274 ± 6,36   | 0,44 ± 0,01 | -16 ± 0,3      |
| 2                | 156 ± 2,12   | 0,24 ± 0,01 | -17 ± 0,3      |
| 3                | 143 ± 2,12   | 0,20 ± 0,02 | - 17 ± 1,1     |
| 4*               | 133 ± 0,71   | 0,17 ± 0,01 | -16 ± 0,8      |
| 5                | 128 ± 1,41   | 0,16 ± 0,01 | - 16 ± 0,1     |
| 6                | 124 ± 1,41   | 0,17 ± 0,01 | -17 ± 0,6      |

\*Após o ciclo 4 não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ )

Nesta comparação de técnicas de produção não foi possível incorporar o componente C<sub>3</sub> devido à baixa quantidade sintetizada para realizar todos os estudos deste projeto. Assim, seguiu-se este estudo utilizando a formulação sem o ativo C<sub>3</sub> para comparar a técnica e verificar a possibilidade de escalonamento desta formulação.

Na tabela 20 está mostrada a caracterização físico-química das NLS produzidas pela técnica de homogeneização à alta pressão. É possível observar que após 4 ciclos do processo, o tamanho médio de nanopartícula e o índice de polidispersão não apresentam diferenças significativas (TUKEY  $p < 0,05$ ). Na tabela 21 é mostrada a caracterização físico-química dos sistemas nanoestruturados lipídicos produzidos pela técnica de ultrassom.

**Tabela 21.** Caracterização físico-química dos sistemas nanoestruturados lipídicos produzidos pela técnica de ultrassom (n=3). Valores apresentados como média ± DP.

|    | Tamanho (nm) | PI           | Potencial Zeta |
|----|--------------|--------------|----------------|
| F1 | 105 ± 3,6    | 0,22 ± 0,006 | -19 ± 2,83     |

De acordo com estudos realizados por SAKULKHUL e colaboradores (2007), a redução do índice de polidispersão pode ser obtida aumentando a pressão de homogeneização e aplicando 3 a 7 ciclos e que após o terceiro ciclo o tamanho médio não muda. Outro estudo realizado por LIU (2007) demonstrou a influência da pressão exercida no sistema sobre o tamanho de partícula. Sob pressão de 500 bar foram produzidas nanopartículas com 143 nm, e o aumento dessa pressão para 1000 bar reduziu ainda mais o tamanho das partículas para 37 nm.

O potencial zeta permite avaliar a carga total que a superfície de uma partícula adquire em um determinado meio. Como esperado, o potencial zeta



não foi alterado pela utilização de técnicas de preparação diferentes ( $p < 0,05$ ). Já o tamanho médio das partículas, assim como o índice de polidispersão, comparando os dados obtidos com as duas técnicas empregadas resultam ser significativamente diferentes (test  $t$   $p < 0,05$ ). O tamanho aumenta em cerca de 25 % quando empregada a técnica por homogeneização à alta pressão e o índice de polidispersão diminui em cerca de 23%.

Na prática, a transição de um sistema de laboratório a um sistema de planta não é direto. O produto é geralmente preparado em escalas intermediárias, em números maiores do que nos estudos iniciais de desenvolvimento, mas menores do que na produção industrial. Basicamente, a ideia consiste em simular a produção tanto quanto possível para otimizar os parâmetros de funcionamento antes do trabalho de grande volume ser realizado. Um procedimento de *scale-up* com base em transferência de técnica bem preparado vai garantir a qualidade do produto, a economia global e a realização atempada de prontidão do mercado.

Basicamente, a ideia consiste em simular a produção tanto quanto possível para otimizar os parâmetros de funcionamento antes do trabalho de grande volume ser realizado. Um procedimento de *scale-up* com base em uma transferência técnica bem preparada vai garantir a qualidade do produto, a economia global e a realização adequada de prontidão no mercado.

Neste trabalho, foi evidenciada a possibilidade de escalonamento. Na técnica de ultrassom o volume total de produção foi de 10 mL, já no processo por homogeneização à alta pressão o volume foi de 500 mL, aumentando 50 vezes o volume da produção. Estudos de escalonamento de formulações mostram que o aumento de volume entre a fase laboratorial e a fase piloto varia de 20 a 50 vezes (GALINDO-RODRÍGUEZ et al., 2005; SHEGOKAR, SINGH, MÜLLER, 2011; YE, SQUILLANTE, 2013).

### 5.8.1. Estudo de Biocompatibilidade

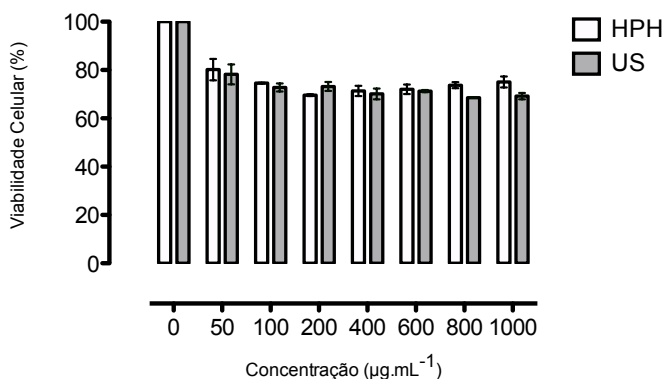
Relatos na literatura sobre o risco de contaminação por titânio, material da sonda de ultrassom, nos motivaram a realizar um estudo de viabilidade celular comparando a mesma formulação, porém produzida por técnicas diferentes (WISSING, KAYSER, MÜLLER, 2004).

Para esta avaliação, foi utilizado o método do MTT que é baseado na utilização de um corante, o Brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio ou Thiazolyl blue (MTT), para determinar a viabilidade celular através da atividade mitocondrial. O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em formazam púrpura insolúvel após a

clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais. O formazam púrpura é determinado em 540 nm sendo proporcional à viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

O perfil de citotoxicidade de NLS em fibroblastos foi investigada pelo ensaio MTT em condições *in vitro*. A viabilidade das células NIH/3T3 foi determinada após incubação das células com diferentes concentrações de NLS durante 24 h. Estes resultados estão apresentados na Figura 35.

**Figura 35.** Ensaio de viabilidade celular após incubação com NLS produzidas pela técnica de homogeneização de alta pressão e pela técnica de ultrassonificação em células de fibroblasto. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT (24 h) e a densidade ótica do grupo controle sem tratamento foi considerada 100% de viabilidade. Cada barra representa Média  $\pm$  EPM (n=3).



Como pode ser observado na Figura 35, as duas preparações apresentaram os mesmos resultados de viabilidade celular o que descarta a possibilidade de citotoxicidade pela contaminação do metal da ponta de ultrassom. Um estudo realizado por SILVA e colaboradores (2011) também comprovaram que não ocorre citotoxicidade celular pelo uso de ponta de ultrassom.

Outra observação importante está relacionada com a dose de nanopartículas incubada com as células. À medida que a concentração da NLS é aumentada, a viabilidade celular é mantida sugerindo que não há relação dependente de concentração aplicando este método, nas condições testadas.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que as técnicas utilizadas, por ultrassom ou por homogeneização de alta pressão, são

métodos adequados para a produção de NLS. Adicionalmente, é possível sugerir que a homogeneização por alta pressão é o método mais adequado para *scale-up*. Por outro lado, a técnica com ultrassom pode ser utilizada como um método adequado para as pesquisas laboratoriais devido à facilidade de preparação e do baixo custo do aparelho requerido. Neste trabalho ficou evidenciado a possibilidade de escalonamento da formulação desenvolvida, uma vez que a alteração do método de preparação garantiu um aumento de escala de 50 vezes.



## **6. CONCLUSÕES**

---



- ✓ Dos doze análogos de pirimidina estudados em três linhagens celulares tumorais (L1210, B16F10 e CEM), os que apresentaram efeito citotóxico relevante foram as moléculas A<sub>5</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> e B<sub>2</sub> e estas moléculas induzem a morte celular por apoptose quando avaliadas pelo Método de Fragmentação do DNA;
- ✓ As NLS produzidas com ácido esteárico mostraram maior citotoxicidade em fibroblasto quando comparados com as NLS produzidas com tripalmitina e monoestearato de glicerila. A morte celular foi por apoptose, confirmada por citometria de fluxo. Somente a formulação contendo ácido esteárico apresentou atividade hemolítica;
- ✓ As formulações estudadas demonstraram boa estabilidade físico-química e apresentaram um tamanho de partícula entre 116 a 306nm com índice de polidispersão entre 0,25 a 0,30 e todas as formulações apresentaram valores negativos para o potencial zeta;
- ✓ No estudo para avaliar a influência do emulsionante e do tipo de lipídeo nas características físico-químicas e na biocompatibilidade de nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com diferentes tipos de lipídeos e diferentes concentrações de emulsionantes ficou evidente que o principal fator para a citotoxicidade celular foi o tipo de lipídeo utilizado;
- ✓ O delineamento experimental aplicado permitiu formular e otimizar com sucesso formulações de NLS com parâmetros físico-químicos satisfatórios, recorrendo a um número mínimo de experimentos com uma maior robustez nas respostas;
- ✓ A influência das variáveis independentes, como concentrações de lipídeo sólido, emulsionantes no tamanho, polidispersão e potencial zeta foi avaliado por análise estatística. Foi possível verificar que o tamanho e o índice de polidispersão das partículas produzidas são fortemente dependentes da concentração de lipídeo sólido que traduz a tendência da coalescência de fases na presença de elevadas concentrações de lipídeo sólido;
- ✓ Os resultados experimentais obtidos na caracterização da formulação otimizada foram muito semelhantes àqueles estimados pelo *software*,

## Conclusões

---

comprovando a robustez e a capacidade preditiva do delineamento experimental para otimização de nanopartículas lipídicas sólidas;

- ✓ A formulação otimizada apresentou resultados satisfatórios quanto à estabilidade físico-química e é possível sugerir que a formulação não é considerada citotóxica nas concentrações estudadas na linhagem celular avaliada (NIH/3T3), podendo ser utilizada por via parenteral uma vez que não apresentou atividade hemolítica;
- ✓ O conjunto dos resultados obtidos no estudo de validação do método analítico permite concluir que o método proposto é adequado e seguro para a quantificação do C<sub>3</sub> em nanopartículas lipídicas sólidas;
- ✓ A NLS otimizada apresentou tamanho médio de partícula de  $105 \pm 3,6$ , com um índice de polidispersão aceitável para uso parenteral ( $0,22 \pm 0,006$ ), e com uma carga negativa superficial (potencial zeta)  $-19 \pm 2,83$  mV, conforme esperado para este tipo nanocarreador. Quando a molécula C3 foi incorporada no sistema nanocarreador foi possível observar que não ocorreu mudança significativa ( $p < 0,05$ ) quanto ao tamanho e o índice de polidispersão;
- ✓ Neste estudo foi possível concluir que os resultados obtidos a partir do potencial zeta mostraram que a molécula C<sub>3</sub> interfere na carga superficial da NLS sugerindo uma adsorção da molécula na superfície na NLS;
- ✓ A alta eficácia de encapsulação revelou a capacidade de NLS de incorporar um fármaco pouco solúvel em água tal como o análogo da pirimidina, o C<sub>3</sub>.
- ✓ O ensaio de liberação revelou a baixa capacidade de dissolução em condições *sink* das NLS em 24 horas de estudo indicando uma maior eficiência na retenção do C<sub>3</sub> pelas NLS;
- ✓ O estudo de estabilidade da NLS com o C<sub>3</sub> incorporado apresentou expulsão e degradação da molécula em NLS quando armazenada a mais de 30 dias;



## Conclusões

---

- ✓ O estudo de liofilização foi uma boa estratégia para contornar os problemas de degradação e expulsão da molécula em função do tempo das NLS, além da trealose ter apresentado boas características crioprotetoras para o sistema;
- ✓ O ensaio de citotoxicidade do C<sub>3</sub> incorporado na NLS e/ou livre, evidenciou que as NLS não alteraram a citotoxicidade do sistema quando incubados em células tumorais L1210;
- ✓ As técnicas de ultrassonificação e homogeneização à alta pressão são dois métodos adequados para a produção de nanopartículas lipídicas sólidas. Neste trabalho evidenciou que a homogeneização de alta pressão é o método mais adequado para o escalonamento industrial e para uso laboratorial, o ultrassom pode ser utilizado como um método adequado para a produção de NLS, devido à facilidade de preparação e de baixo custo do aparelho requerido;
- ✓ As técnicas de ultrassonificação e homogeneização à alta pressão apresentaram características que proporcionaram a obtenção dos mesmos resultados de viabilidade celular o que descarta a possibilidade de citotoxicidade pela contaminação do metal da ponta de ultrassom.

Desta maneira, como conclusão geral deste trabalho, foi possível desenvolver um nanocarreador com características adequadas para encapsular um análogo de pirimidina, pouco solúvel, que apresentou alta citotoxicidade em células L1210, promovendo morte celular por apoptose, uma característica interessante para moléculas anti-neoplásicas. Assim, este estudo viabiliza a administração parenteral e torna este sistema adequado para testes futuros *in vivo*.



## **7. REFERÊNCIAS**

---



ABDELWAHED, W., DEGOBERT, G., FESSI, H. A pilot study of freeze drying of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl alcohol): formulation and process optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v.309, n.1-2, p.178-188. 2006.

ABREU, F. O. M. S., BIANCHINI, C., FORTE, M. M. C., KIST, T. B. L. Influence of the composition and preparation method on the morphology and swelling behavior of alginate-chitosan hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 2, p. 283-289, 2008.

ACHESON, R. M. In: **Introduction to the chemistry of heterocyclic compounds**, Wiley Interscience: New York, ed. 3, 1976.

ALLISON, S.D., RANDOLPH, T. W., MANNING, M.C., MIDDLETON, K., DAVIS, A., CARPENTER, J.F. Effects of drying methods and additives on structure and function of actin: mechanisms of dehydration-induced damage and its inhibition. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 358, p.171-181, 1998.

ALMEIDA, V. L., LEITÃO, A., et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que integram com o DNA: uma introdução. **Química Nova**. v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

AMIJI, M. M. Nanotechnology – Improving Targeted Delivery. **Drug Delivery**, p. 53 – 56 2007.

ANNA, R.S. Stability of lipid excipients in solid lipid nanoparticles. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 59, p. 411-418, 2007.

ARMSTRONG, S.A., LOOK, A.T. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v.23, p. 6306–6315, 2005.

ARNIDA, JANÁT-AMSBURY, M.M.; RAY, A.; PETERSON, C.M.; GHANDEHARI, H. Geometry and surface characteristics of gold nanoparticles influence their biodistribution and uptake by macrophages. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v. 77, p. 417-423, 2011.

AUVILLAIN, M., CAVE, G., FESSI, H., DEVISSAGUET, P. J. Lyophilisation de vecteurs colloïdaux submicroniques. **S.T.P. Pharma**, v. 5, p.738-744, 1989.

AVGOUSTAKIS, K. Pegylated poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: preparation, properties and possible applications in drug delivery. **Current Drug Delivery**, v. 4, p. 321- 333, 2004.

AYEN, W.Y., KUMAR, N. A. Systematic study on lyophilization process of polymersomes for long-term storage using doxorubicin-loaded (PEG)3, PLA nanopolymersomes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.46, n. 5, p. 405-414, 2012.

AZEVEDO, M.M.M. **Nanoesferas E A Liberação Controlada De Fármacos**. Monografia. LQES - Laboratório de Química do Estado Sólido. Instituto de Química. UNICAMP. 2002.

BAE, D.H., SHIN, J.S., JIN, F.L., SHIN, G.S., PARK, S.J. Effect of hydrogenated lecithin on cytotoxicity of liposome. **Bull. Korean Chem. Soc.** v. 30, p. 339-342, 2009.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**, Ed. UNICAMP: Campinas, 1996.

BOCCA, C., CAPUTO, O., CAVALLI, R., GABRIEL, L., MIGLIETTA, A., GASCO, M. R. Phagocytic uptake of fluorescent stealth and non-stealth solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 175, n. 2, p. 185-193, 1998.

BOHREN, C. F., HUFFMAN, D. R. **Absorption and Scattering of Light by Small Particles**, Wiley-Interscience: New York, 1983.

BOLHASSANI A. Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**. v. 1816, n. 2, p. 232-246, 2011.

BOREK, F. Culture of animal cells: A manual of basic technique. **Journal of Immunological Methods**, v. 183, n. 2, p. 291-291, 1995.

BOSTROM, B.C., et al. Dexamethasone versus prednisone and daily oral

versus weekly intravenous mercaptopurine for patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. **Blood**, v. 101, p. 3809–3817, 2003.

BRANNON-PEPPAS, L., BLANCHETTE, J.O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. **Advanced Drug Delivery**, v. 56, n.11, p. 1649-1659, 2004.

BRÁS, M., QUEENAN, B. et al. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 231-239, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº 899, de 29 maio 2003. **Diário Oficial da União**, 02 junho 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativas 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

BRIGGER, I., DUBERNET, C., COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.54, p. 631-651, 2002.

BROWN, D. J. **Pirimidines and Their Benzo Derivatives**, Comprehensive Heterocyclic Chemistry, v. 3, Pergamon, Oxford, 1984.

BROWN, S.C., KAMAL, M., NASREEN, N., BAUMURATOV, A., SHARMA, P., ANTONY, V.B., MOUDGIL, B.M. Influence of shape, adhesion and simulated lung mechanics on amorphous silica nanoparticle toxicity. **Adv. Powder Technol.** v. 18, p. 69-79, 2007.

BRUCKMAN, M.A., RANDOLPH, L.N., VANMETER, A., HERN, S., SHOFFSTALL, A.J., TAUROG, R.E., STEINMETZ, N.F. Biodistribution, pharmacokinetics, and blood compatibility of native and PEGylated tobacco mosaic virus nano-rods and -spheres in mice. **Virol. J.** v. 449, p. 163-173, 2014.

BRUXEL, F., LAUX, M., WILD, L. B., FRAGA, M., KOESTER, L. S., TEIXEIRA, H. S. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827 – 1840, 2012.

BUNJES, H., WESTESEN, K., KOCH, M.H.J. Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles. **International Journal Pharmaceutics** v. 129, p. 159–173, 1996.

BURKE, V.P., STARTZEKK, J.M. The Leukemias, **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, v. 20, p. 597–608, 2008.

BUTTON, S.T. **Metodologia para planejamento experimental e análise de resultado** (Apostila). Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, 2001.

CAVALLI, R., CAPUTO, O., CARLOTTI, M.E., TROTTA, M., SCARNECCHIA, C., GASCO, M.R. Sterilization and freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 148, p. 47-54, 1997.

CAVALLI, R., CAPUTO, O., MARENGO, E., PATTARINO, F., GASCO, M. R. The effect of the components of microemulsions on both size and crystalline structure of solid lipid nanoparticles (SLN) containing a series of models molecules. **Pharmazie**, v. 53, p. 392 – 396, 1998.

CEYHAN, S.T., ONGURU, O., FIDAN, U., IDE, T., YAMAN, H., KILIC, S., et al. Comparison of aromatase inhibitor (letrozole) and immunomodulators (infliximab and etanercept) on the regression of endometriotic implants in a rat model. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. v. 154, n. 1, p.100-104, 2011.

COHEN, J.J. Apoptosis. **Immunology Today** v. 14, p. 126-130, 1993.

COTTER, T. G. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field, **Nature Reviews Cancer**, p. 501-507, 2009.

CROWE, L. M., REID, D. S., CROWE, J. H. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? **Biophysical Journal**, v.71, n.4, p. 2087-2093, 1996.

DANHIER, F., ANSORENA, E., SILVA, J.M., COCO R., LE BRETON A., PRÉAT V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 505-522, 2012.



DAS, S., CHAUDHURY, A. Recent Advances in Lipid Nanoparticle Formulations with Solid Matrix for Oral Drug Delivery, **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 1 p. 62 – 76, 2011.

DAS, S., NG, W. K., TAN, R. B. H. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLSs? **Europeann Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p. 139 – 151, 2012.

DATE, A. A., NAGARSENKER, M. S. Parenteral microemulsions: An overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, n. 1 – 2, p. 19 – 30, 2008.

DE CHASTEIGNER, S., CAVE, G., FESSI, H., DEVISSAGUET, J.P., PUISIEUX, F. Freeze-drying of itraconazole-loaded nanosphere suspensions: A feasibility study. **Drug Development Research**. v. 38, n.2, p.116-124, 1996.

DEBATIN, K.M. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 53, p. 153-59, 2004.

DEL POZO-RODRÍGUEZ, A., SOLINÍS, M.A., GASCÓN, A.R., PEDRAZ, J.L. Short and long-term stability study of lyophilized solid lipid nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 2, p.181-189. 2008.

DILLER, L. Adult Primary Care after Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **The New Englando Journal of Medicine**, v. 365, p. 1417-1424, 2011.

DUAN, J., ZHANG, Y., HAN, S., CHEN, Y., LI, B., LIAO, M., et al. Synthesis and in vitro/in vivo anti-cancer evaluation of curcumin-loaded chitosan/poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 400, p. 211-220, 2010.

EDINGER, A. L., THOMPSON, C. B. Death by design: apoptosis, necrosis, and autophagy. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, p. 663-669, 2004.

ELDEM, P, T. SPEISER, A. HINCAL, Optimization of spray-dried and congealed lipid micropellets and characterization of their surface morphology

by scanning electron microscopy, **Pharmaceutical Research**, v. 8, p. 47–54, 1991.

ELSAIED, M.M.A., ABSALLAH, O.Y., NAGGAR, V.F., KHALAFALLAH, N.M. Lipids vesicles for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research. **International Journal Pharmaceutics**, v. 332, n.1-2, p. 1-16, 2007.

ETHERIDGE, M. L., CAMPBELL, S. A., ERDMAN, A. G., HAYNES, C.L., WOLF, S. M., McCULLOUGH, J. The big Picture on nanomedicine: the state of investigational and aproved nanomedicine products. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1 – 14, 2013.

FADERL, S., JEHA, S., KANTARJIAN, H.M. The biology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v. 98, n. 7, p. 1337–1354, 2003.

FANG, J.Y., FANG, C.L., LIU, C.H., SU, Y.H. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (NLS) versus nanostructured lipid carriers (NLC). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.70 n. 2, p. 633-640, 2008.

FERREIRA, I. E. P., TRINCA, L. A., FERREIRA, C. P. Delineamentos experimentais eficientes para estudos de cinética química. **Química Nova**, v. 37, p. 589 – 596, 2014.

FLORENCE, A.T., ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, p. 29-66, 2003.

FREITAS, C., MÜLLER, R.H. Spray-drying of solid lipid nanoparticles (NLS™). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 46, p. 145–151, 1998.

FREITAS, S., HIELSCHER, G., MERKLE, H. P., GANDER, B. Continuous contact- and contamination-free ultrasonic emulsification-a useful tool for pharmaceutical development and production. **Ultrasonics Sonochemistry**, n. 13, p. 76-85, 2006.

GABRIELSSON, J., LINDBERG, N. O., LUNDSTEDT, T. Multivariate methods in pharmaceutical applications. **Journal of Chemometrics**, v. 16, n. 3, p. 141-160, 2002.

GALINDO-RODRÍGUEZ, S. A., PUEL, F., BRIANÇON, S., ALLÉMANN, E., DOELKER, E., FESSI, H. Comparative scale-up of three methods for producing ibuprofen-loaded nanoparticles, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, n. 4–5, 2005.

GALMARINI, C. M., MACKEY, J.R., DUMONTET, C. Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment, **The Lancet Oncology**, p. 415-424, 2002.

GALMARINI, C.M., MACKEY, J.R., DUMONTET, C. Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies, **Leukemia**, n. 15, p. 875- 890, 2001.

GALMARINI, C.M., POPOWYCZ, F., JOSEPH, B. Cytotoxic nucleoside analogues: different strategies to improve their clinical efficacy, **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 1072-1082, 2008.

GAMBACORTA, A., TOFANI, D., LORETO, M. A., GASPEN, T., BERNINI, R. HSAB-driven chemoselective N<sup>1</sup>-alkylation of pyrimidine bases and their 4-methoxy- or 4-acetylamino-derivatives. **Tetrahedron**, v. 62, p. 6848 - 6854, 2006.

GARG N.K., DWIVEDI P., CAMPBELL C., TYAGI R.K. Site specific/targeted delivery of gemcitabine through anisamide anchored chitosan/poly ethylene glycol nanoparticles: An improved understanding of lung cancer therapeutic intervention. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 47, n.5, p. 1006-1014, 2012.

GARTI, N.; WELLNER, E.; SARIG, S. Effect of surfactants on crystal structure modification of stearic acid. **Journal of Cryst. Growth**, v. 57, p. 577 – 584, 1982.

GASCO, M.R., Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. **US Patent 5 250 236**: Italy, 1993.

GILCHRIST, T. L. Heterocyclic Chemistry, 2<sup>o</sup> Edição. Ed. Longman Sientific & Technicla, p. 252, 1992.

GILES, F. VERSTOVSEK, S., GARCIA-MANERO, G., THOMAS, D., RAVANDI, F., WIERDA, W., FERRAJOLI, A., KORNBLAU, S., JABBOUR, E., SHAN, J., O'BRIEN, S., ALBITAR, M., KANTARJIAN, H. Validation of the European Prognostic Index for younger adult patients with acute myeloid leukaemia in first relapse, **British Journal of Haematology**, v. 134, p. 58-60, 2006.

GIRON, D. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 68, p. 335-357, 2002.

GRAUX, C. Biology of acute lymphoblastic leukemia (ALL): Clinical and therapeutic relevance. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 44, p. 183-189, 2011.

GREAVES, M. F. Stem cell origins of leukaemia and curability. **British Journal of Cancer**, v. 67, n. 3, p. 413-423, 1993.

GREAVES, M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. **Nature Reviews**, v. 6, p. 193-203, 2006.

GREAVES, M. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. **European Journal of Cancer**, v. 35, n. 2, p. 173-185, 1999.

GREF, R., COUVREUR, P. Nanocapsules: preparation, characterization and therapeutic application. **Nanoparticulates as Drug Carriers**. p. 255 - 276, 2006.

GREF, R., DOMB, A., QUELLEC, P., BLUNK, T., MÜLLER, R. H., VERBAVATZ, J. M., LANGER, R. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.16, p. 215-233, 1995.

GRIVICICH, REGNER, ROCHA, Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335 – 343, 2007.

GUAN, T., MIAO, Y., XU, L., YANG, S., WANG, J., HE, H., et al. Injectable nimodipine-loaded nanoliposomes: Preparation, lyophilization and

- characteristics. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 410, p. 180-187, 2011.
- GUCHELAAR, H.J., RICHEL, D.J., VAN KNAPEN, A. Clinical, toxicological and pharmacological aspects of gemcitabine, **Cancer Treatment Reviews** v. 22, p. 15-31, 1996.
- GUPTE, A., CIFTCI, K. Formulation and characterization of paclitaxel, 5-FU and paclitaxel + 5-FU microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 276, p. 93-106, 2004.
- GUYTON, A. C., HALL, J. E., Resistência do corpo à infecções: Leucócitos, granulócitos, sistema monocítico-macrofágico e inflamação. In: GUYTON, A. C., HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**, ed. 12. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011, p. 437.
- HAFNER, A.; LOVRIÉ, J.; VOINOVICH, D.; FILIPOVIÉ-GRÉIÉ, J. Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: Physicochemical characterisation and permeability through Caco-2 cell monolayers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 381, p. 205-213, 2009.
- HALEY, B., FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 26, p. 57-64, 2008.
- HAN, R. Research and Development of Anticancer Drugs and Experimental Techniques. Beijing: **Pekin Medical University Pekin Union Medical College joint Publishing House**, p. 395-399, 1997.
- HANAHAN, D., WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n.5, p. 646-674, 2011.
- HATTORI, H., et al., Nucleosides and nucleotides. 175. Structural requirements of the sugar moiety for the antitumor activities of new nucleoside antimetabolites, 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)cytosine and -uracil, **Journal of Medical Chemistry**, p. 2892 - 2902, 1998.
- HEIDARI MAJD, M., ASGARI, D., BARAR, J., VALIZADEH, H., KAFIL, V., ABADPOUR, A., et al. Tamoxifen loaded folic acid armed

PEGylated magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy of cancer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 106, p. 117-125, 2013.

HELGASON, T. S., AWAD, K., KRISTBERGSSON, MCCLEMENTS, D. J., WEISS, J. Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN). **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 334, n. 1, p. 75 – 81, 2009.

HERR, I.; DEBATIN, K.M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. **Blood**, v. 98, n. 9, p. 2603-2614, 2001.

HEURTAULT, B., SAULNIER, P., PECH, B., PROUST, J.E., BENOIT, J.P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, p. 4283-4300, 2003.

HIELSHER, T. **Ultrasonic production of nano-size dispersions and emulsions**. Paris, France, p. 14-16, 2005.

HIRSJARVI, S., PELTONEN, L., HIRVONEN, J. Effect of sugars, surfactant, and tangential flow filtration on the freeze-drying of poly(lactic acid) nanoparticles. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 2, p.488-494. 2009.

HOFFMANN, F., CINATL JR, J., KABICKOVÁ, H., CINATL, J., KREUTER, J., STIENEKER, F. Preparation, characterization and cytotoxicity of methylmethacrylate copolymer nanoparticles with a permanent positive surface charge. **International Journal Pharmaceutics**, v. 157, p. 157- 189, 1997.

HOU, D., XIE, C., HUANG, K., ZHU, C. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (NLSS). **Biomaterials**, v. 24, n. 10, p. 1781–1785, 2003.

HU, F.-Q., JIANG, S.-P., DU, Y.-Z., YUAN, H., YE, Y.-Q., ZENG, S. Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers. **International of Journal Pharmaceutics**, v. 314, n. 1, p. 83–89, 2006.

HUGHES, G.A. Nanostructure-mediated drug delivery. **Nanomedicine**, v.1, n.1, p. 22-30, 2005.

HUO, J., ZHOU, S.W. New research on development of solid lipid nanoparticles. **Journal of Medical Colleges of PLA**, v. 22 n. 6, p. 385-390, 2007.

ICH- International Conference on Harmonization of Technical Requeriments for Registration of Pharmaceuticals for Human use: **Q2(R1)-Validation of Analytical procedures: methodology**, 2005.

ISP 10993-5 I. **Biological evaluation of medical devices** – part 5: tests for in vitro cytotoxicity. 2009.

JABR-MILANE, L., VLERKEN, L., DEVALAPALLY, H., SHENOY, D., KOMAREDDY, S., BHAVSAR, M., AMIJI, M. Multi-functional nanocarriers for targeted delivery of drugs and genes. **Journal of Control Release**, v. 130, n. 2, p. 121 – 128, 2008.

JAFARI, S. M., HE, Y., BHANDARI, B. Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques. **Journal of Food Engineering**, n. 82, p. 478-488, 2007.

JÄGER, A., STEFANI, V., GUTERRES, S.S., POHLMANN, A.R. Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. **International Journal Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 338, n.1-2, p. 297-305, 2007.

JANSEN, B., ZANGEMEISTER-WITTKE, U. Antisense therapy for cancer, Äthe time of truth. **The Lancet Oncology**, v. 3, n. 11, p. 672-683, 2002.

JONES, B., GOOS, P. I-optimal versus D-optimal split-plot response surface designs. **Journal of Quality Technology**, v. 44, n. 85-101, 2012.

JOSHI M, PATHAK S, SHARMA S, PATRAVALE V. Design and in vivo pharmacodynamic evaluation of nanostructured lipid carriers for parenteral delivery of artemether: Nanoject. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, n.1, p. 119-126, 2008.

JOSHI, M. D., MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.71, n. 2, p. 161-172, 2009.

JUN, H. S.; PARK, T. et al. Capsaicin induced apoptosis of B16-F10 melanoma cells through down-regulation of bcl-2. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 708 - 715, 2007.

KANEKO, K., KATAYAMA, H., WAKABAYASHI, T., KUMANAKA, S. **Synthesis** p. 152, 1988.

KANGO, S., KALIA, S., CELLI, A., NJUGUNA, J., HABIBI, Y., KUMAR, R. Surface modification of inorganic nanoparticles for development of organic - inorganic nanocomposites - review. **Progress in Polymer Science**. v. 38, n. 8, p. 1232 – 1261, 2013.

KATRITZKY, A. R., DRUM, C. A. in: **Comprehensive Heterocyclic Chemistry**, Pergamon Press: Oxford, v.1 ed. 2, p. 47, 1995.

KAWASAKI, E. S., PLAYER, A. Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer. **Nanomedicine**, v 1, n. 2, p.101-109, 2005.

KHERADMANDNIA, S., VASHEGHANI-FARAHANI, E., NOSRATI, M., ATYABI, F. Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**. v. 6, n. 6, p.753-759, 2010.

KHURANA, S., BEDI, P.M.S., JAIN, N.K. Preparation and evaluation of solid lipid nanoparticles based nanogel for dermal delivery of meloxicam, **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 175–176, p. 65-72, 2013.

KIM, K.Y. Nanotechnology platforms and physiological challenges for cancer therapeutics. **Nanomedicine**, v. 3, n. 2, p. 103-110, 2007.

KONAN, Y. N., GURNY, R., ALLEMANN, E. Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 233, n. 1-2, p. 239-252, 2002.

KUMAR A. S, ABHIJIT A. D., MEDHA D. JOSHI, VANDANA B. P., Solid lipid nanoparticles (NLS) of tretinoin: Potential in topical delivery, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 345, n. 1–2, 2007.



KUMARI, A., YADAV, S.K., YADAV, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

KUO, Y. C., SHIH-HUANG, C. Y. Solid lipid nanoparticles with surface antibody for targeting the brain and inhibiting lymphatic phagocytosis. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, 2014, v. 45, n. 4, p. 1154-1163, 2014.

LANGE, B.J., et al. Double-delayed intensific cation improves event-free survival for children with intermediate-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. **Blood**, v. 99, p. 825-833, 2002.

LAZARUS, H.M., et al. Central nervous system involvement in adult acute lymphoblastic leukemia at diagnosis: results from the international ALL trial MRC UKALL XII/ECOG E2993. **Blood**, v. 108, p. 465 - 472, 2006.

LEDNICER, D, MITSCHER, L. A. **The organic chemistr drug synthesis**, v. 2, p. 152, 1988.

LEE, J. M. PARK, K. M., LIM, S. J., LEE, M. K., KIN, C. K. Microemulsion formulation of clonixic acid: solubility enhancement and pain reduction. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p. 43 - 49, 2002.

LEGRAND, P., BARRATT, G., MOSQUEIRA, V. C. F., FESSI, H., DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: A review. **S.T.P. Pharma Sciences**, v. 9, p. 411-418. 1999.

LI, F., WANG, T., HE, H.B., TANG, X. The properties of bufadienolides-loaded nano-emulsion and submicro-emulsion during lyophilization. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 349, n. 1 - 2, p. 291-299, 2008.

LIM, S. J., KIM, C. K. Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 24, p. 135 - 146, 2002.

LIMA, E. M. Lipossomas: Estrutura, propriedades, aplicações. 209 f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

LIU, C.H., WU, C.T., Optimization of nanostructured lipid carriers for lutein delivery, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 353, n. 2–3, p. 149-156, 2010.

LIU, J., GONG, T., FU, H., WANG, C., WANG, X., CHEN, Q., ZHANG, Q., HE, Q., ZHANG, Z. Solid lipid nanoparticles for pulmonary delivery of insulin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 356, 333-344, 2008.

LIU, J., HU, W., CHEN, H., NI, Q., XU, H., YANG, X. Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, n. 2, p. 191–195, 2007.

LIVERSIDGE-MERISKO, E., LIVERSIDGE, G.G. Nanosizing for oral and parenteral drug delivery: A perspective on formulation poorly-water soluble compounds using wet media milling technology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 427 – 440, 2011.

LOCATELLI, C., CARVALHO, D. R., MASCARELLO, A., CORDOVA, C. A. S., YUNES, R., A., NUNES, R. J. PILATI, C., CRECZYNSKI-PASA, T. B. Antimetastatic activity and low systemic toxicity of tetradecyl gallate in a preclinical melanoma mouse model. **Investigational New Drugs**, v. 30, p. 870-879, 2012.

LOO, D.M., et al. Prognostic significance of blasts in the cerebrospinal fluid without pleiocytosis or a traumatic lumbar puncture in children with acute lymphoblastic leukemia: the experience of the Dutch Childhood Oncology Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, p. 2332–2336, 2004.

LOPES, R., ELEUTÉRIO, C.V., GONÇALVES, L.M.D., CRUZ, M.E.M., ALMEIDA, A.J. Lipid nanoparticles containing oryzalin for the treatment of leishmaniasis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, 442-450, 2012.

LORENZI, T.F. Patologia dos Leucócitos. **In: Manual de Hematologia. Procedência e Clínica**. 3<sup>a</sup> Edição. 2003.

MAA, Y. F., HSU, C. C. Performance of sonication and microfluidization for liquid-liquid emulsification. **Pharmaceutical Development of technology**, v. 4, n. 2, p. 233-240, 1999.

MACEWAN, S.R., CALLAHAN, D.J., CHILKOTI, A. Stimulus-responsive macromolecules and Nanoparticles for cancer drug delivery. **Nanomedicine**, v. 5, p. 793-806, 2010.

MADHAVAN, G. R., CHAKRABARTI R., VIKRAMADITHYAN R. K., MAMIDI R. N., BALRAJU V., RAJESH, B.M., MISRA. P., KUMAR, S.K., LOHRAY, B.B., LOHRAY, V.B., RAJAGOPALAN, R. Synthesis and biological activity of novel pyrimidinone containing thiazolidinedione derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 8, p. 2671-2680, 2002.

MARQUES, M. R. C., BROWN, W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas. **Revista Analytica**, n. 1, p. 48-51, 2002.

MARTINS, S., COSTA-LIMA, S., CARNEIRO, T., CORDEIRO-DA-SILVA, A., SOUTO, E.B., FERREIRA, D.C. Solid lipid nanoparticles as intracellular drug transporters: An investigation of the uptake mechanism and pathway. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 430 n. 1-2, p. 216-227, 2012.

MATSUMURA, Y., MAEDA, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent SMANCS, **Cancer Research**, v. 46, p. 6387–6392, 1986.

MEHNERT, W., MÁDER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 2 – 3, p.165-196, 2012.

MEN, Y, AUDRAN, R, THOMASIN, C, EBERL, G, DEMOTZ, S, MERKLE, H.P, GANDER, B, CORRADIN, G. MHC class I- AND class II-restricted processing and presentation of microencapsulated antigens. **Vaccine**, v. 17, n. 9-10, p. 1047-1056, 1999.

MITRI, K., SHEGOKAR, R., GOHLA, S., ANSELM, C., MÜLLER, R. H. Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: Preparation, characterization, stability and performance. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 414, n. 1-2, p. 267-275, 2011.

MITTAL, A.K., CHISTI, Y., BANERJEE, U.C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology Advances**, v. 31 n. 2, p. 346-356, 2013.

MOHANRAJ, V.J., CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutics Research**, v.5, n. 1, p. 561-573, 2006.

MONTASSER, I., FESSI, H., COLEMAN., A. W. Atomic force microscopy imaging of novel type of polymeric colloidal nanostructures. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.54, n.3, p. 281-284. 2002.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**, 3<sup>rd</sup> ed., John Wiley: New York, 1991.

MORECO, M. A., FRUTOS, P., BALLESTEROS, M. P. Lyophilized lecithin based oil-water microemulsions as a new and low toxic delivery system for Amphotericin B. **Pharmaceutical Research**, v. 18, p. 344 – 351, 2001.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, **Journal of Immunological and Methods**, p. 55-63, 1983.

MÜLLER, H.R., MEHNERT, W., LUCKS, J.S., SCHWARZ, C., ZUR MÜHLEN, A., WEYHERS, H.; FREITAS, C., RÜHL, D. Solid lipid nanoparticles (SLN): an alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery, **European Journal of Pharmaceutics Biopharaeutics**, v. 41, p. 62-69, 1995.

MÜLLER, R. H. et al., Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): Drug-lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 3, p. 535 – 544, 2008.

MÜLLER, R. H., MADER, K., GOHLA, S., Solid lipid nanoparticles (SLN) form controlled drug delivery – Areview of the state of art, **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 161 – 177, 2000.

- MÜLLER, R.H., LUCKS, J.S., Azneistoffträger aus festen lipidteilchen – feste lipid nanosphären (SLN), **European Patent 0605497**: Germany, 1996.
- MÜLLER, R.H., MAASSEN, S., WEYHERS, H., MEHNERT, W. Phagocytic uptake and cytotoxicity of solid lipid nanoparticles (NLS) sterically stabilized with poloxamine 908 and poloxamer 407, **Journal of Drug Targeting**, v. 4, p. 161–170, 1996.
- MÜLLER, R.H., RUNGE, S., RAVELLI, V., MEHNERT, W., THÜNEMANN, A.F., SOUTO, E.B. Oral bioavailability of cyclosporine: solid lipid nanoparticles (SLN) versus drug nanocrystals. **Intenational Journal of Pharmaceutical**, v. 317, p. 82-89, 2006.
- MUNFORD, M. L., LIMA, V. R., VIEIRA, T. O., HEINZELMANN, G., CRECZYNSKI-PASA, T. B., PASA, A. A. AFM in-situ characterization of supported phospholipid layers formed by vesicle fusion. **Microscopy & Microanalysis**, v. 11, n.3, p. 90-93, 2005.
- MUSSI, S.V., SILVA, R.C., OLIVEIRA, M.N.C.D., LUCCI, C.M., AZEVEDO, R.B.D., FERREIRA, L.A.N.M. New approach to improve encapsulation and antitumor activity of doxorubicin loaded in solid lipid nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48 n. 1 – 2, p. 282-290, 2013.
- MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C.; ANDERSON-COOK, C. M. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments**, 3<sup>a</sup> ed., Wiley: Nova Iorque, 2009.
- NICHOLSON, D.W. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. **Nature**, v. 407, p. 810-816, 2000.
- NUSSBAUMER, S., BONNABRY, P., VEUTHEY, J.-L., FLEURY-SOUVERAIN, S. Analysis of anticancer drugs: A review, **Talanta**, v. 85, p. 2265-2289, 2011.
- OKADA, H., MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Natures Review Cancer**, v. 4, p. 592 – 603, 2004.
- OLIVO M, BHUVANESWARI R, LUCKY SS, DENDUKURI N, SOO-PING THONG P. Targeted Therapy of Cancer Using Photodynamic Therapy

in Combination with Multi-faceted Anti-Tumor Modalities. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 5, p. 1507-1529, 2010.

ONCIU, M. Acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 23, p. 655–674, 2009.

OUZINEB, K., LORD, C., LESAUZE, N., GRAILLAT, C., TANGUY, P. A., MCKENNA, T. Homogenisation devices for the production of miniemulsions. **Chemical Engineering Science**, n. 61, p. 2994-3000, 2006.

PACHOLSKI, I., BLANCO, I., ZANATTA, MARTINS, N., M. 4-Alkoxy-1,1,1-trihalo-3-alken-2-ones as building blocks for trihalomethylated heterocycles, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, p. 118-120, 1990.

PANDITA, D., KUMAR, S., POONIA, N., LATHER, V. Solid lipid nanoparticles enhance oral bioavailability of resveratrol, a natural polyphenol. **Food Research International**, v. 62, p. 1165 – 1174, 2014.

PARDEIKE, J., HOMMOSS, A., MÜLLER, R.H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 366, p. 170-184, 2009.

PARK, K. Nanotechnology: What it can do for drug delivery. **Journal of Control Release**, v. 120, n.1, p. 1-3, 2007.

PARK, S.R., CHEN, A. Poly(Adenosine Diphosphate,ÄiRibose) Polymerase Inhibitors in Cancer Treatment. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 26, n. 3, p. 649-670, 2012.

PATIDAR, A., THAKUR, D. S., KUMAR, P., VERMA, J. A review on novel lipid based nanocarries. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 4, p. 30 – 35, 2010.

PATIL, M. N., PANDIT, A.B. Cavitation: A novel technique for making stable nano-suspensions. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 14, n. 5, p. 519-530, 2007.

PEDERSEN, N., HANSEN, S., HEYDENREICH, A.V., KRISTENSEN, H.G., POULSEN, H.S. Solid lipid nanoparticles can effectively bind DNA,

streptavidin and biotinylated ligands. **European Journal of Pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 62, n. 2, p. 155-162, 2006.

PEER, D., KARP, J. M., HONG, S., FAROKHAZAD, O. C., MARGALIT, R., LANGER, R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. **Nature Nanotechnology**, v. 2, p. 751 – 760, 2007.

PEJOVIC, T., SCHWARTZ, P.E. Leukemias. **Clinicla Obstetrics Ginecology**, v. 45, p. 866-878, 2002.

PEREVERZEVA, E., TRESCHALIN, I., BODYAGIN, D., MAKSIMENKO, O., LANGER, K., DREIS, S., ASMUSSEN, B., KREUTER, J., GELPERINA, S. Influence of the formulation on the tolerance profile of nanoparticle-bound doxorubicin in healthy rats: Focus on cardio- and testicular toxicity. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 337, p. 346-356, 2007.

PETERSEN, S., STEINIGER, F., FISCHER, D., FAHR, A., BUNJES, H. The physical state of lipid nanoparticles influences their effect on in vitro cell viability. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 150-161, 2011.

PHARMACOPEIAL FORUM. **Pharmacopeial Previews**, v. 30 n. 1, p. 351-363, 2004.

PLASSCHAERT, S. L., KAMPS, W. A. et al. Prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia: a question of maturation? **Cancer Treatment Review**, v. 30, n. 1, p. 37-51, 2004.

POHLMANN, A. R., WEISS, V., MERTINS, O., PESCE DA SILVEIRA, N., GUTERRES, S. S. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. **European Journal of Pharmaceutics Science**, v. 16, p. 305 – 312, 2002.

POUTON, C.W., PORTER, C.J.H. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods and strategies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 625-637, 2008.

PRAKASH, S., MALHOTRA, M., SHAO, W., TOMARO-DUCHESNEAU,

C., ABBASI, S. Polymeric nanohybrids and functionalized carbon nanotubes as drug delivery carriers for cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 6, n. 15, p. 1340-1351, 2011.

PRIYANKA, K., ABDUL, HASAN, S.A. Preparation and Evaluation of Montelukast Sodium Loaded Solid Lipid Nanoparticles. **Journal of Young Pharmacists**, v. 4 n. 3 p. 129-137, 2012.

PUI, C. H., EVANS, W. E. Acute lymphoblastic Leucemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 9, p. 605-615, 1998.

PUI, C.H. Toward optimal central nervous system-directed treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 2, p. 179-181, 2003.

PUI, C.H., EVANS, W.E. Drug therapy - Treatment of acute lymphoblastic leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 2, p. 166-178, 2006.

PUI, C.H., JEHA, S. New therapeutic strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. **Nature reviews**, v. 6, n. 2, p. 149-165, 2007.

RANGEL, L. P., WINTER, E., GAUTHIER, C., TERREUX, R., CHIARADIA-DELATORRE, L. D., MASCARELLO, A., NUNES, R. J., YUNES, R. A., CRECZYNSKI-PASA, T. B., MACALOU, S., LORENDEAU, D., BAUBICHON-CORTAY, H., PEREIRA, A. F., DI PIETRO, A. New Structure-Activity Relationships of Chalcone of Breast Cancer Resistance Protein: Polyspecificity toward Inhibition and Critical Substitutions against Cytotoxicity. **Drug Design Development Therapy**, v. 7, p. 1043-1052, 2013.

RAVINDRAN, A., CHANDRAN, P., KHAN, S.S. Biofunctionalized silver nanoparticles: Advances and prospects. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 105, p. 342-352, 2013.

RAWAT, M., SINGH, D., SARAF, S., SARAF, S. Nanocarriers: Promising vehicles for bioactive drugs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 9, p. 1790-1798, 2006.

RICHARDSON, R.B. Promotional etiology for common childhood acute



lymphoblastic leukemia: The infective lymphoid recovery hypothesis. **Leukemia Research**, v. 35, p. 1425-1431, 2011.

ROBAK, T., WIERZBOWSKA, A. Current and Emerging Therapies for Acute Myeloid Leukemia. **Clinical Therapeutics**, v. 31, p. 2349-2370, 2009.

RODRIGUES, J.S., SANTOS-MAGALHAES, N.S., COELHO, L.C.B.B., COUVREUR, P., PONCHEL, G., GREL, R. Novel core(polyester) shell (polysaccharide) nanoparticles: protein loading and surface modification with lectins. **Journal of Controlled Release**, v. 92, n.1-2, p.103-112, 2003.

SAEZ, A., GUZMAN, M., MOLPECERES, J., ABERTURAS, M. R. Freeze-drying of polycaprolactone and poly(D,L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 3, p. 379-387, 2000.

SAHOO, S.K., PARVEEN, S., PANDA, J.J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, p. 20-31, 2007.

SAKATA, S., UCHIDA, K., KAETSU, I., KITA, Y. Programming control of intelligent drug releases in response to single and binary environmental stimulation signals using sensor and electroresponsive hydrogel. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 76, n. 4, p. 733-737, 2007.

SAKULKHUL, U., JARUPAIBOON, S., TRITHONG, A., PRATHONTEPL, S., JANYAPRASERT, V., PUTTIPIATKHACHORN, S., RUKTANONCHAIL, U. Production and Characterization of Rice bran extract encapsulated in Solid Lipid Nanoparticles for Dermal Delivery. **International Journal of Research in drug delivery**, v. 1, n. 2, p. 6 – 9, 2011.

SALADINO, R., CIAMBECCINI U., MAGA G, MASTROMARINO P, CONTI C, BOTTA M.A new and efficient synthesis of substituted 6-[(2'-dialkylamino)ethyl] pyrimidine and 4-N,N-dialkyl-6-vinyl-cytosine derivatives and evaluation of their anti-rubella activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 7, p. 2143-2153, 2002.

SALIMBENI, A., et al. N-3-substituted pyrimidinones as potent, orally active, AT1 selective angiotensin II receptor antagonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 38, p. 4806-4820, 1995.

SALUM, L. B., ALTEI, W. F., CHIARADIA, L. D., CORDEIRO, M. N. S., CANEVAROLO, R. R., SOUZA, C., WINTER, E., MATTEI, B., DAGHESTANI, H. N., SILVA, M. C. S., CRECZYNSKI-PASA, T. B., YUNES, R., A., AYUNES, J. A., ANDRICOPULO, A. D., DAY, B. W., NUNES, R. J., VOGT, A. Cytotoxic 3,4,5-trimethoxychalcones as mitotic arresters and cell migration inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, p. 501-510, 2013.

SAMBO, F., BORROTTI, M., MYLONA, K. A coordinate-exchange two-phase local search algorithm for the D- and I-optimal designs of split-plot experiments. **Computational Statistics & Data Analysis**, v. 71, p. 1193-1207, 2014.

SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W. Molecular Cloning: a laboratory manual. 3. ed. New York: **Cold Spring Harbor**, Appendix 8 - Quantitation of nucleic acids, p.19 – 21, 2001.

SANTAGATI, A., MODICA, M., SANTAGATI, M., CARUSO, A., CUTULI V. Synthesis of 2,3-dihydro-3-amino-6-phenyl-2-thioxothieno [2,3-d] pyrimidin-4 (1H)-one and of potential antiinflammatory agents 2-aryl-7-phenyl-3H, 9H-pyrimido [2,1-b]thieno-[2',3':4,5]]1,3,4] thiadiazin-9-ones. **Pharmazie**, v. 49 n.1, p. 64-65, 1994.

SANTOS, N.P.S., NASCIMENTO, S.C., WANDERLEY, M.S.O., PONTES-FILHO, N.T., SILVA, J.F., CASTRO, C.M.M.B., PEREIRA, E.C., SILVA, N.H., HONDA, N.K., SANTOS- MAGALHAES, N.S. Nanoencapsulation of usnic acid: An attempt to improve antitumor activity and reduce hepatotoxicity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 64, p.154-160, 2006.

SARASTE, A.L., PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, v. 45, p. 528 – 537, 2000.

SCHAFFAZICK, S. R., GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L., POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos

nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, 2003.

SCHWARZ, C., MEHNERT, W. Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 157, p. 171-179, 1997.

SECKER-WALKER, L. M., CRAIG, J. M., HAWKINS, J. M., HOFFBRAND, A.V. Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia in adults: age distribution, BCR breakpoint and prognostic significance. **Leukemia**, v. 5, n. 3, p. 196-199, 1991.

SHALVIRI, A., RAVAL, G., PRASAD, P., CHAN, C., LIU, Q., HEERKLOTZ, H., et al. pH-Dependent doxorubicin release from terpolymer of starch, polymethacrylic acid and polysorbate 80 nanoparticles for overcoming multi-drug resistance in human breast cancer cells. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, n. 3, p. 587-597, 2012.

SHEGOKAR, R., MÜLLER, R.H. Nanocrystals: Industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 399, n. 1-2, p. 129-139, 2010.

SHEGOKAR, R., SINGH, K. K., MÜLLER, R. H. Production and stability of stavudine solid lipid nanoparticles—From lab to industrial scale, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 416, n. 2, p. 461-470, 2011.

SILVA, A.C., AMARAL, M.H., GONZÁLEZ-MIRA, E., SANTOS, D., FERREIRA, D. Solid lipid nanoparticles (NLS) - based hydrogels as potential carriers for oral transmucosal delivery of Risperidone: Preparation and characterization studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, p. 241-248, 2012a.

SILVA, A.C., GONZÁLEZ-MIRA E., GARCÍA, M.L., EGEA, M.A., FONSECA, J., SILVA, R., et al. Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (NLS): High pressure homogenization versus ultrasound. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, n. 1, p. 158-165, 2011.

SILVA, A.H., FILIPPIN-MONTEIRO, F.B., MATTEI, B., ZANETTI-RAMOS, B.G., CRECZYNSKI-PASA, T.B. In vitro biocompatibility of solid lipid nanoparticles. **Science of Total Environment**, v. 432, p. 382-388, 2012b.

SOUTO, E.B.; MÜLLER, R. H. Investigation of the factors influencing the incorporation of clotrimazole in SLN and NLC prepared by hot high-pressure homogenization. **Journal of Microencapsulation**. v. 23, n. 4, p. 377-388, 2006.

SREEDHAR, A.S., CSERMELY, P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: A comprehensive review. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 101, n. 3, p. 227-257, 2004.

STOCK, W. Adolescents and Young Adults with Acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematology**, p. 21-29, 2010.

STRICKLEY, R.G. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 2, p. 201 – 230, 2004.

SZCZEPANSKI, T., VAN DER VELDEN, V. H. VAN DONGEN, J. J. Classification systems for acute and chronic leukaemias. **Best Practice Research & Clinical Haematology**, v. 16, n.4, p. 561-582, 2003.

TALPAZ, M., et al. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, p. 2531-2541, 2006.

TANGEDA, S. J., GARLAPATI, A. Synthesis of new pyrrolo[2,3-d]pyrimidine derivatives and evaluation of their activities against human colon cancer cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 45, p. 1453-1458, 2010.

TEMPLE, D.L., YEVICH, J. P., COVINGTON, R. R., HANNING, C. A., SEIDEHAMEL, R. J., MACHEY H. K., BARTEK, M. J. Synthesis of 3,4-dihydro-4-oxothieno[2,3-d]pyrimidine-2-carboxylates, a new series of orally active antiallergy agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 22 n. 5, p. 505-510, 1979.

THOMPSON, R.H., ALLISON, J.P., KWON, E.D. Anti-cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) immunotherapy for the treatment of prostate

cancer. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 24, n. 5, p. 442-447, 2006.

TORCHILIN, V. P. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 73, n.1-2, p. 137-172, 2001.

TORCHILIN, V. P. Target pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. **AAPS J**, v. 9, n. 2, p. 128-147, 2007.

TOYODA, Y., et al., Six months of maintenance chemotherapy after intensified treatment for acute lymphoblastic leukemia of childhood. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, p. 1508–1516, 2000.

ÜNER, M. Preparation, characterization and physico-chemical proprieties of solid lipid nanoparticles (NLS) and nanostructure lipid carriers (NCL): Their benefits as colloidal drug carrier system. **Phamazie**, v. 61, n. 5, p. 375-386, 2006.

VARGAS, A., EID, M., FANCHAOUY, M., GURNY, R., DELIE, F. In vivo photodynamic activity of photosensitizer-loaded nanoparticles: Formulation properties, administration parameters and biological issues involved in PDT outcome. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 43-53, 2008.

VARSHOSAZ, J., ESKANDARI, S., TABBAKHIAN, M. Freeze-drying of nanostructure lipid carriers by different carbohydrate polymers used as cryoprotectants. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n 4, p. 1157 – 1163, 2012.

VENKATESWARLU. V., MANJUNATH, K. Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles. **Journal of Control Release**, v. 95, p. 627-638, 2004.

VITALE, A. The changing scene of adult acute lymphoblastic leukemia. **Current Opinion in Oncology**, v. 18, n. 6, p. 652-659, 2006.

VROEGOP, S.M., CHAPMAN, D.L., DECKER, D.E., et al. Pharmacokinetic properties, induction of interferon, and efficacy of selected 5-halo-6-phenyl pyrimidinones, bropirimine analogues, in a model

of severe experimental autoimmune encephalomyelitis. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 21, n. 10, p. 647-662, 1999.

WANG, J. J., LIU, K. S., SUNG, K. C., TSAI, C. Y., FANG, J. Y. Lipid nanoparticles with different oil/fatty ester ratios as carriers of buprenorphine and its produgs for injection. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, p. 138 – 146, 2009.

WANG, Y., WANG, C., GONG, C., WANG, Y., GUO, G., LUO, F., QIAN, Z. Polysorbate 80 coated poly ( $\epsilon$ -caprolactone)–poly (ethylene glycol)–poly ( $\epsilon$ -caprolactone) micelles for paclitaxel delivery. **International of Journal Pharmaceutical**, v. 434, p. 1-8, 2012.

WANGA, M., THANOU, M. Targeting nanoparticles to cancer. **Pharmacological Research**, v. 62, n. 2, p. 90-99, 2010 .

WERKEMA, M.C.C. **Planejamento e análise de experimentos: como identificar e avaliar as principais variáveis influentes em um processo**. Belo Horizonte: Fundação Christiano Ottoni, p.143-184, 1996.

WEYENBERG W., FILEV P., VAN DEN PLAS D., VANDERVOORT J, DE SMET K, SOLLIE P., et al. Cytotoxicity of submicron emulsions and solid lipid nanoparticles for dermal application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 337, n. 1 – 2, p. 291-298, 2007.

WHITE, D. C., GREENWOOD, T. D., DOWNEY, A. L., BLOOMQUIST, J. R., WOLF, J. F. Synthesis and anticonvulsant evaluation of some new 2-substituted-3-arylpyrido[2,3-d]pyrimidinones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21 n. 12, p. 5711-5717, 2004.

WHO - World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer>>, Acesso em maio de 2014.

WISSING, S.A., KAYSER, O., MÜLLER, R.H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n.9, p.1257-1272, 2004a.

WISSING, S.A., MÜLLER, R.H., MANTHEL, L., MAYER, C. Structural characterization of Q10-loaded solid lipid nanoparticles by NMR spectroscopy. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 3, p. 400–405, 2004b.

WOLINSKY, J.B., COLSON, Y.L., GRINSTAFF, M.W. Local drug delivery strategies for cancer treatment: Gels, nanoparticles, polymeric films, rods, and wafers. **Journal of Controlled Release**, v. 159, n. 1, p. 14-26, 2012.

WU, L., ZHANG, J., WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 456-469, 2011.

YANG, F., JIN, C., JIANG, Y., LI, J., DI, Y., NI, Q., et al. Liposome based delivery systems in pancreatic cancer treatment: From bench to bedside. **Cancer Treatment Reviews**, v. 37, n. 8, p. 633-642, 2011.

YANG, L., WU, S., ZHANG, Q., LIU, F., WU, P. 23,24-Dihydrocucurbitacin B induces G2/M cell-cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis in human breast cancer cells (Bcap37). **Cancer Letters**, v. 256, p. 267-278, 2007.

YE, Z., SQUILLANTE, E. The development and scale-up of biodegradable polymeric nanoparticles loaded with ibuprofen, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 422, p. 75-80, 2013.

YEZHELYEV, M.V., GAO, X., XING, Y., AL-HAJJ, A., NIE, S., O'REGAN, R. M. Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. **The Lancet Oncology**, v. 7, p. 657-667, 2006.

Yuan, H.; Zhang, W.; Du, Y.Z.; Hu, F.Q. Ternary nanoparticles of anionic lipid nanoparticles/protamine/DNA for gene delivery. **International of Journal of Pharmaceutical**, v. 392, p. 224-231, 2010.

ZANATTA, N., et al. N-Alkylation of 4-Trichloromethylpyrimidinones: synthesis of Some New and Interesting Modified Nucleoside Analogues. **Organic Chemistry Insights**. v. 2, 2009.

ZANATTA, N., FLORES, D.C., AMARAL, S.S., BONACORSO, H.G., MARTINS, M.A.P., FLORES, A.F.C. Design and Synthesis of Novel Trichloromethylated N-Azolylmethyl-1H-pyrimidin-2-ones and Related N-Methylenaminones, **ChemInform** v. 37, 2006.

ZEISSER-LABOUEBE, M., LANGE, N., GURNY, R., DELIE, F. Hypericin-loaded nanoparticles for the photodynamic treatment of ovarian

cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 326, n. 1-2 p. 174-181, 2006.

ZHANG, G., et al. Effect of dimethyl sulfides on the induction of apoptosis in human leukemia Jurkat cells and HL-60 cells. **Bioscience Biothecnology Biochemistry**, v. 72, n. 11, p. 2966-2972, 2008.

ZIMMERMANN, E., MÜLLER, R.H., MADER, K. Influence of different parameters on reconstitution of lyophilized NLS. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 196, n. 2, p. 211-213, 2000.